

**Entwicklung neuer polykationischer Rezeptoren zur  
molekularen Erkennung und als Vektoren in der  
Gentransfektion**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrads

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin

**Ute Schlund geb. Michels**

*geboren in Temeschburg (Rumänien)*

Institut für Organische Chemie

Universität Duisburg-Essen

Essen 2013



Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2008 bis November 2013 am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Prof. Dr. Carsten Schmuck durchgeführt.

Eingereicht am: 26. November 2013

Gutachter: Prof. Dr. Carsten Schmuck

Prof. Dr. Thomas Schrader

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Eckhard Spohr

Tag der Disputation: 28. März 2014





# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Carsten Schmuck für die Möglichkeit, meine Promotion auf einem so interessanten und vielseitigen Themengebiet wie der Supramolekularen Chemie durchgeführt zu haben. Vielen Dank für die Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen, durch die ich immer wieder neue Wege entdeckt und vieles dazu gelernt habe.

Vielen Dank auch an den gesamten Arbeitskreis für ein sehr gutes Arbeitsklima und ein kollegiales Miteinander. Insbesondere möchte ich meinen Laborkollegen Dipl. Chem. Barbara Geibel, Dr. Michael Merschky, Dr. Sebastian Langolf, Dipl. Chem. Julia Schulz und Martin Ehlers für eine stets sehr positive Arbeitsatmosphäre und das Zusammensein innerhalb und außerhalb der Universität danken.

Ein sehr herzliches Dankeschön an Dipl. Ing. Wilhelm Sicking für die theoretischen Berechnungen am Protein P97. Vielen Dank Willi für die vielen interessanten, lehrreichen und lustigen Stunden vor deinem PC.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Hemmo Meyer vom ZMB für die interessante fachübergreifende Kooperation und seiner Mitarbeiterin Dr. Christina Kamp-Meltzer für die Bereitstellung des Proteins P97 und die Durchführung des ATPase-Assays.

Danke auch an *Franziska V. Dietrich*, die die Transfektionsmessungen in der Arbeitsgruppe von *Prof. Knauer* am Institut für Biologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt hat.

Ein großer Dank geht auch an die analytische Abteilung, Dr. Torsten Schaller und Dipl.-Ing. Heinz Bandmann für die Durchführung und die Hilfe bei der Interpretation von NMR-Messungen und an Dipl.-Ing. Werner Karow für die MS-Messungen. Werner Karow möchte ich speziell für die Einarbeitung und eine gute Zusammenarbeit in der Massenspektrometrieabteilung danken.

Vielen Dank auch an die zahlreichen Azubis, studentischen Helfer und meinem Bachelor-Studenten Sascha Saddler, für die Durchführung wichtiger Synthesen.

Vielen Dank an M. Sc. Lina Bartsch, M. Sc. Sandra Junghänel, Dipl. Chem. Patrycusz Piotrowski, Dr. Sebastian Schlund, Dipl. Chem. Julia Schulz für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich vielfach bei Prof. Thomas Schrader für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danke auch an die vielen lieben Kollegen außerhalb des Arbeitskreises, die ich durch meinen Umzug nach Essen kennenlernen durfte und die mich herzlichst im Ruhrgebiet aufgenommen haben.

Zum Schluss ein ganz persönliches Dankeschön an meine Familie für ihren geleisteten Beistand. Danke, dass ihr mir meinen Weg ermöglicht habt und mich auf diesem Weg auch stets unterstützt habt.

Danke an meinen Ehemann. Weil du immer an mich geglaubt hast.

*Wo die Natur bei der Erzeugung ihrer eigenen Spezies aufhört,  
beginnt der Mensch unter Nutzung natürlicher Dinge  
und mit Hilfe dieser Natur eine unendlich große  
Menge von Spezies zu kreieren.*

Leonardo da Vinci

*“Mankind is divisible into two great classes: hosts and guests.”*

Max Beerbohm

---

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b><i>Grundlagen und Methoden</i></b> .....	<b>5</b>
2.1	Supramolekulare Chemie .....	5
2.2	Synthetische Rezeptoren zur Bindung von Oxo-Anionen.....	11
2.3	Calixarene als makrocyclische Rezeptoren .....	13
2.3.1	Amphiphile Calixarene bilden Micellen aus .....	16
2.3.2	Erkennung von Aminosäuren durch wasserlösliche Calixarene .....	17
2.3.3	Erkennung von Proteinoberflächen durch synthetische Calixaren-basierte Moleküle .....	19
2.4	Bindungsstudien zur Untersuchung von Rezeptor-Substrat-Komplexen .....	24
2.4.1	Aufbau von Nucleotiden und Nucleinsäuren und ihre molekulare Erkennung _	24
2.5	Gentransfektion .....	29
2.6	Die Atpase P97 .....	37
2.7	Methoden zur Bestimmung der Assoziationskonstanten von Rezeptor-Substrat-Komplexen.....	40
2.7.1	UV/Vis-Titration .....	42
2.7.2	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) .....	43
2.7.3	Rasterkraftmikroskopie (AFM) .....	46
2.7.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	48
2.7.5	Thermische Denaturierung .....	49
2.7.6	Ethidiumbromid-Verdrängungsassay .....	50
<b>3</b>	<b><i>Motivation und Zielsetzung</i></b> .....	<b>53</b>
<b>4</b>	<b><i>Durchführung und Diskussion</i></b> .....	<b>59</b>
4.1	Ein multivalenter Rezeptor zur Erkennung von Oxo-Anionen auf einer Proteinoberfläche .....	59
4.1.1	Synthese eines flexiblen bipolaren Rezeptors <b>65</b> .....	60
4.1.2	Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Rezeptors <b>65</b> ____	75
4.1.3	Bindungsstudien des Rezeptors <b>65</b> mit verschiedenen Substraten .....	81
4.1.4	Versuche zur Protein-Oberflächenerkennung von P97 mit Rezeptor <b>65</b> ____	94

<b>4.2</b>	<b>Ein synthetischer Rezeptors zur Gentransfektion.....</b>	<b>99</b>
4.2.1	Synthese des amphiphilen Rezeptors <b>90</b> .....	99
4.2.2	Eigenschaften des Amphiphils <b>90</b> .....	106
4.2.3	Gentransfektion .....	110
4.2.4	Strukturanalyse der gebildeten Aggregate von <b>90</b> mit ctDNA mittels Rasterkraftmikroskopie .....	113
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der Wechselwirkung von ctDNA mit den Rezeptoren 65 und 90 ....</b>	<b>117</b>
4.3.1	Bestimmung von DNA-Wechselwirkungen mittels Thermischer Denaturierung .....	117
4.3.2	Bestimmung der Bindungskonstanten der Verbindungen <b>65</b> und <b>90</b> mit ctDNA anhand eines Ethidiumbromid-Verdrängungsassays .....	122
4.3.3	Bestimmungen zur Komplexbildung von <b>65</b> mit ctDNA mittels ITC .....	124
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung und Ausblick.....</i></b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b><i>Summary and prospects .....</i></b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b><i>Experimenteller Teil.....</i></b>	<b>145</b>
7.1	Experimentelle Angaben.....	145
7.2	Analytische Methoden.....	147
7.3	Synthesen.....	150
7.3.1	Synthese des Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden .....	150
7.3.2	Funktionalisierung des Calix[4]aren-Grundgerüsts am <i>upper rim</i> .....	159
7.3.3	Funktionalisierung des Calix[4]aren-Grundgerüsts am <i>lower rim</i> .....	169
7.4	Methoden zur Bestimmung von Bindungskonstanten .....	179
<b>8</b>	<b><i>Anhang.....</i></b>	<b>189</b>
8.1	Definitionen .....	189
8.2	Abkürzungsverzeichnis .....	191
8.3	Zusätzliche Experimentelle Daten .....	193
8.4	Literaturverzeichnis .....	207
8.5	Publikationsliste.....	213
8.6	Lebenslauf .....	214

---

# 1 EINLEITUNG

---

Die Supramolekulare Chemie ist ein eigenständiges Forschungsgebiet, welches am Anfang der 1960er Jahre mit der Synthese von makrozyklischen Rezeptoren für Metallkationen wie die Kronenether von *Pederson et al.*, die dreidimensionalen Cryptanden von *Lehn et al.* oder die Sphäranden von *Cram et al.* zu wachsen begann. Diese Pionierarbeiten von *Donald J. Cram*, *Jean-Marie Lehn* und *Charles J. Pederson* führten 1987 zur Auszeichnung mit dem Nobelpreis. Bis heute bearbeitet die Supramolekulare Chemie spannende Herausforderungen, wobei sie dabei die Chemie, Biologie, Physik und ganz aktuell die Nanotechnologie interdisziplinär miteinander verbindet. Sie ist definiert als die Chemie der molekularen Assoziation von Molekülen und beschreibt die nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat. Die thermodynamische Stabilität eines Rezeptor-Substrat-Komplexes in einem gegebenen Lösemittel bei einer konstanten Temperatur wird durch die Größe der Bindungskonstanten bestimmt. Typische Bindungskonstanten für Kronenether und Alkali-Metallkationen in Wasser befinden sich im Bereich von  $10^1 - 10^2 \text{ M}^{-1}$ , in Methanol steigen sie auf  $10^6 \text{ M}^{-1}$  für z. B.  $[\text{K}[18]\text{Krone-6}]^+$  und sogar auf einen Wert von  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  für  $\text{K}^+$  und [2.2.2]Cryptand.<sup>1</sup>

Viele der Ideen und Entwicklungen in der Supramolekularen Chemie entstammen der Chemie in lebenden biologischen Systemen. Die Natur hat eine Vielzahl an hochspezifischen, hierarchischen, selektiven und kooperativen Systemen entwickelt, welche lebende Organismen dazu befähigt, in einem ständigen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung zu stehen. Darunter spielt u. a. die Koordination von Anionen eine bedeutende Rolle. Mindestens 14 mitochondriale Anion-Transportsysteme sind z. B. bis heute identifiziert, wobei verschiedenste Anionen, wie z. B. ADP, ATP, Citrat, Phosphat, Glutamat, Fumarat, Malat, Oxalacetat und Halogenide transportiert werden. Anionen spielen auch in biochemischen Prozessen als Enzym Substrate und Cofaktoren eine wichtige Rolle. Zum Beispiel bindet der Phosphatrest in ADP oder ATP nichtkovalent an ein ATPase-Enzym, das Teil des

Energietransports in der Atmungskette ist. Eine besonders wichtige Aminosäure in vielen kationischen Bindungstaschen von proteinogenen Rezeptoren ist Arginin, welches effektiv Phosphate, Sulfate und Carboxylate bindet. Arginin selbst stellt eine Aminosäure mit einer hydrophoben Seitenkette und einer hydrophilen terminalen Guanidingruppe dar. Diese hat eine hohe Protonenaffinität mit einem  $pK_s$  von 13.5 und liegt deshalb auch unter physiologischen Bedingungen immer protoniert vor. Der kationische Rest kann deshalb neben Wasserstoffbrückenbindungen auch starke Salzbrücken mit anionischen Substraten ausbilden. Ein Beispiel eines natürlich vorkommenden Arginin-basierten anionischen Rezeptors ist die Carboxypeptidase A (CPA), welche für die hydrolytische Spaltung einer C-terminalen Peptidbindung verantwortlich ist. Dabei wird das Carboxylat über eine Ionenpaar-Bindung mit der Guanidiniumgruppe des Arg 145 und zusätzlich mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit Asn 144 und Tyr 248 gebunden.<sup>2,3</sup>

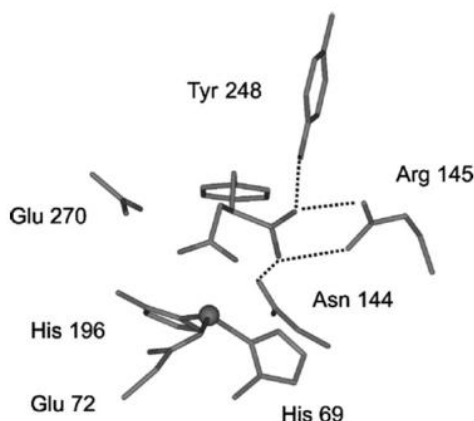


Abb. 1-1 Bindung des Inhibitors Benzylglutaminsäure im aktiven Zentrum der CPA. Das Carboxylat wird über eine Ionenpaar-Bindung mit Arg 145 und zusätzlich mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit Asn 144 und Tyr 248 gebunden. (Copyright 2013 Elsevier. Verwendet mit Genehmigung.<sup>4</sup>)

Ohne eine hydrophobe Abschirmung innerhalb einer Enzymtasche ist eine Ionen-Bindung zwischen einem Guanidinium-Kation und einem Carboxylat-Anion in polaren Lösemitteln wie DMSO, Wasser und Methanol allerdings nicht stabil.

Im Laufe der 1970er wurden in Anlehnung an solche Erkenntnisse die ersten künstlichen Guanidinium-basierten Rezeptoren entwickelt. Dazu zählen Makrocyclen mit zwei bis drei Guanidiniumeinheiten wie Molekül **1** von *Lehn et al.* In den frühen 1980ern entwickelten dann *Schmidtchen et al.* und *de Mendoza et al.* kationische bicyclische Guanidiniumsysteme, z. B. **2** für eine Komplexierung von Oxo-Anionen in Chloroform. Jedoch waren diese Komplexe nur in unpolaren Lösemitteln stabil. Dann erkannte man, dass die Ausbildung mehrerer auch schwacher Wechselwirkungen neben dieser einen ionischen Wechselwirkung

auch in polaren Lösemitteln zu stabilen Komplexen führen kann. Dies wird auch als der sogenannte Gulliver Effekt-bezeichnet.



Abb. 1-2 Der Riese Gulliver wird von vielen schwachen Tauen gehalten. (Abdruck mit Genehmigung von Ueberreuter Verlag GmbH, Berlin)

Damit gelang es dann u. a. *Hamilton et al.* den Bisguanidinium-basierten Rezeptor **3** zu entwickeln, welcher nun auch in polaren Lösemitteln zu stabilen Komplexen mit Phosphaten und Carboxylaten führte.<sup>5</sup> Eine weitere Entwicklung gelang 1999 *Schmuck et al.* mit dem Design des Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptors **4**. Durch die Einführung eines Acyl-Guanidiums erniedrigt sich der  $pK_s$ -Wert im Vergleich zu einem einfachen Guanidinium von etwa 13 auf einen Bereich von 7-8. Diese erhöhte Acidität führt zu einer erleichterten Ausbildung einer Wasserstoffbrücken-gestützten Ionenbindung und damit zu einer gesteigerten Bindungsaffinität. Auf diese Weise sind sogar Komplexierungen in sehr polaren Lösemitteln wie DMSO möglich.<sup>6</sup>

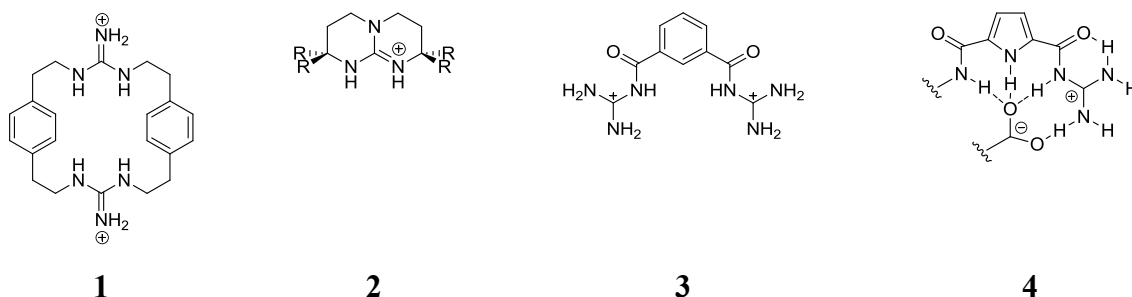
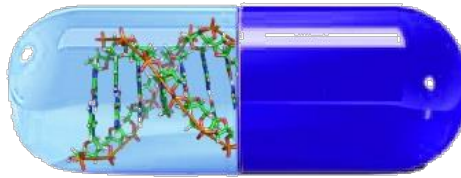


Abb. 1-3 Beispiele einer Guanidinium-basierter Rezeptoren zur Erkennung von Anionen.

Dieses Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv (GCP) soll aufgrund seiner herausragenden Eigenschaften im Rahmen dieser Arbeit in multivalenten Rezeptoren eingesetzt werden. Die Bindungseigenschaften dieses neuen synthetischen Rezeptoren sollen für biologisch relevante Oxo-Anionen untersucht werden und damit das Ziel einer selektiven Erkennung von sauren Aminosäuren auf einer Proteinoberfläche angestrebt werden.

Diese neuen Rezeptoren sollen aufgrund der Bindungseigenschaften des GCP-Bindungsmotivs im Rahmen dieser Arbeit auch auf ihr Potential als Vektoren zur Gentransfektion untersucht werden. Die Gentransfektion ist ein wichtiger molekularer Prozess

in der Gentherapie. Darunter versteht man das Einbringen von Genen mithilfe geeigneter Übertragungsmethoden in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Funktion dieser Gene therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen.<sup>7</sup> Im Vergleich zur klassischen Medizin, bei welcher ein Wirkstoff von außen in den Körper gebracht wird, bietet die Gentherapie die Möglichkeit, genetische Information im Inneren des Körpers so zu verändern, dass eine gestörte Biosynthese korrigiert werden kann.



*Abb. 1-4 Im Vergleich zur klassischen Medizin, bei welcher ein Wirkstoff von außen in den Körper gebracht wird, bietet die Gentherapie die Möglichkeit, genetische Information im Inneren des Körpers zu verändern.*

In allen gentherapeutischen Ansätzen erfolgt ein Transfer von Nucleinsäuren durch Transportsysteme, den sogenannten Vektoren, in die Zellen. Angestrebte Eigenschaften sind dabei eine Langzeitwirkung, eine systemische oder lokale Regulierbarkeit der Genexpression, eine relativ milde Einflussnahme und möglichst geringe Nebenwirkungen.<sup>8</sup>

Allerdings befindet sich diese neue Therapieform, was ihren Einsatz am Patienten angeht, noch in der Entwicklungsphase. Trotz erster Erfolge unter Einsatz von sehr effektiven Vektoren auf Basis von natürlichen Viren, sind noch Rückschläge und Nebenwirkungen zu verzeichnen.<sup>9-11</sup> In der Gentransfektion sind chemische Vektoren immer noch nicht so effizient wie virale Vektoren. Sie stoßen im Vergleich zu den viralen auf viele extra- und intrazelluläre Hindernisse, die es zu überwinden gilt. Die Forschung konzentriert sich deshalb auf die Entwicklung von synthetischen, wenig zytotoxischen Transportsystemen, welche die Oligonucleotide verdichten und während des Transports zum Zielort schützen.

Die Suche nach Alternativen zu viralen Vektoren hat zu einer unglaublichen Zahl von nichtviralen Vektorsystemen geführt. Unterschiedlichste Strukturen auf der Basis von Lipiden, Polymeren und anorganischen Verbindungen wurden auf ihre Eignung als Transfektionssysteme für DNA untersucht. Die Euphorie der frühen Studien führte zur Entdeckung immer neuer Verbindungen und Partikelsysteme, aber auch zur Frage, welche dieser Systeme denn nun am besten geeignet ist. Auf diesem spannenden Gebiet sollen nun mit neuartigen kleinen und mit nur wenig kationischen Bindungsstellen funktionalisierten Rezeptoren auf ihre Fähigkeit zum Transport von DNA untersucht werden.



---

## 2 GRUNDLAGEN UND METHODEN

---

### 2.1 SUPRAMOLEKULARE CHEMIE

Die Supramolekulare Chemie ist der Überbegriff für die Chemie der intermolekularen Bindung im Unterschied zur klassischen molekularen Chemie, die sich mit der Knüpfung von kovalenten Bindungen beschäftigt. Im Mittelpunkt stehen hierbei die Strukturen und Funktionen von Einheiten, die durch Assoziation von zwei oder mehr chemischen Spezies gebildet werden. Zur Beschreibung einer solchen Wechselwirkung entwickelte *Emil Fischer* bereits 1894 das Schlüssel-Schloss-Prinzip, auch Templat-Prinzip genannt.<sup>12</sup> Es beschreibt, dass die Funktion eines Enzyms von der räumlichen Struktur des Substrates abhängt und nur ein zum Enzym komplementäres Molekül mit diesem optimal wechselwirken kann. Dazu findet man auch in der Natur viele Prozesse, welche entsprechend auf hochspezifischer Erkennung, Translokation und Transformation basieren. Dazu zählen z. B. die Substratbindung an ein Rezeptorprotein, alle enzymatischen Reaktionen, die Assemblierung von Multiprotein-Komplexen, Translation und Transkription des genetischen Codes sowie Signalinduktion durch Neurotransmitter. *Fischers* grundlegendes Konzept seines Schlüssel-Schloss-Prinzips, mit dem die Enzymspezifität und die Enzymaktivität sechzig Jahre lang erklärt werden konnte, musste allerdings zur Erklärung dieser Prozesse modifiziert werden.<sup>13</sup> 1958 wurde von *Daniel Edward Koshland, Jr.* die Induced-Fit-Theorie postuliert.<sup>14</sup> Diese neue Theorie umfasste immer noch das Konzept der Komplementarität von Enzym und Substrat, aber führte zudem das Konzept des verformbaren Enzyms ein. Dieses Konzept erlaubt ein besseres Verständnis der Regulation, der Kooperativität und der Spezifität.

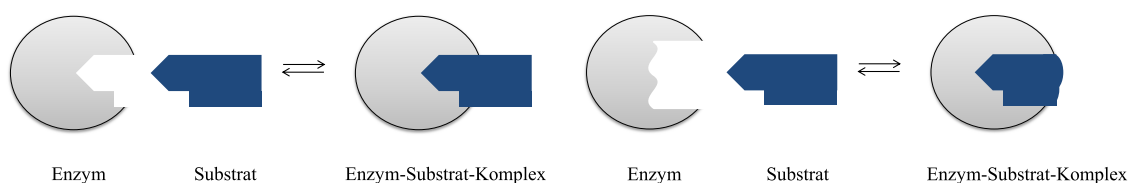


Abb. 2-1 Modelle zur Beschreibung einer Enzym-Substrat-Erkennung; links: Fischers Schlüssel-Schloss-Prinzip; rechts: Koshlands Theorie der induzierten Anpassung.

Dieses Modell zur Beschreibung von Enzym-Substrat-Komplexen ist übertragbar auf synthetische Rezeptor-Substrat-Komplexe. Supramolekulare Spezies sind im Allgemeinen sowohl durch die räumliche Anordnung der Komponenten, ihre Architektur oder Superstruktur und durch die Natur der intermolekularen Bindungen, die alles zusammen halten, charakterisiert. Sie besitzen genau festgelegte strukturelle, konformative, thermodynamische, kinetische und dynamische Eigenschaften, d. h. die Bindungspartner müssen sich zuerst über eine Verschiebung (Translation) treffen und eine für die Bindung geeignete Struktur annehmen. Erst dann treten enthalpische und entropische Beiträge durch die Ausbildung von Wechselwirkungen und Lösemittleffekte hinzu (Abb. 2-5).

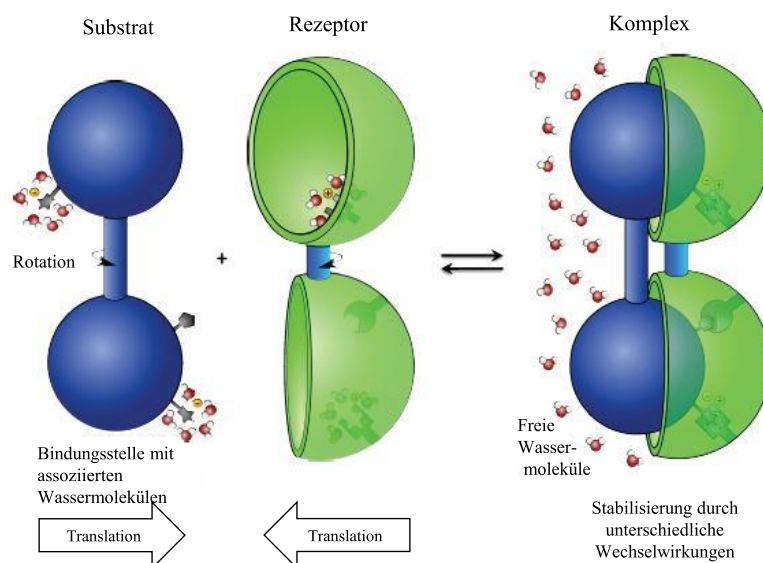


Abb. 2-2 Schematische Darstellung einer Komplexbildung. Verschiedenste Bedingungen müssen erfüllt sein, damit es zu einer Ausbildung eines Komplexes kommt.<sup>15</sup>

Zur Bezeichnung der beiden Komponenten werden im Folgenden die Begriffe Rezeptor und Substrat verwendet. Das Substrat ist in der Regel die kleinere Verbindung, deren Erkennung angestrebt wird. Die selektive Bindung eines spezifischen Substrates  $\delta$  mit seinem Rezeptor  $\rho$  führt zu einem Supermolekül  $\rho\delta$  und beinhaltet einen molekularen Erkennungsprozess. Komplexere Funktionen können aus dem Wechselspiel mehrerer Bindungseinheiten resultieren.<sup>16</sup> Die Struktur des Rezeptorsystems hängt dabei von der Art des Substrates ab. Ein Rezeptor sollte so aufgebaut sein, dass seine Form und seine Bindungsstellen dem Substrat

gegenüber möglichst komplementär sind. Das Design von künstlichen, abiotischen Systemen, welche in der Lage sind, Prozesse höchster Effizienz und Selektivität einzugehen, erfordert die gezielte Beeinflussung der energetischen und stereochemischen Eigenschaften der nichtkovalenten, intermolekularen Kräfte (darunter elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte etc.) innerhalb einer definierten molekularen Architektur. Darunter sind die Wasserstoffbrückenbindungen schwache bis moderate und Metall-Ion-Koordinationen sehr starke Wechselwirkungen.<sup>17</sup> Wasserstoffbrücken führen zu Assoziationskonstanten im Bereich von Enzym-Substrat-Komplexen, wohingegen eine einzelne Metall-Ion-Koordination im Bereich von Antigen-Antikörper-Komplexen, welche aus vielen einzelnen Interaktionen bestehen, anzusiedeln ist. In Tab. 2-1 sind die verschiedenen Wechselwirkungstypen mit ihrer jeweiligen Bindungsenergie und einem typischen Beispiel aufgelistet.

Wechselwirkung		Bindungsenergie (kJ mol <sup>-1</sup> )	Beispiel
Ion-Ion		100 - 350	NaCl
Ion-Dipol		50 - 200	Na <sup>+</sup> -18[Krone]-6-Komplex
Wasserstoffbrücken	stark	60 - 120	HF
	mittel	16 - 60	Nukleobasen
	schwach	< 12	C—H···O H-Brücke
Kation- $\pi$		5 - 80	K <sup>+</sup> -Benzol-Komplex
$\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkung		0 - 50	DNA
Dipol-Dipol		5 - 50	Carbonylgruppen
Van-der-Waals		< 5	Unpolare Lösemittel

Tab. 2-1 Auflistung der verschiedenen nichtkovalenten Wechselwirkungen mit einem typischen Beispiel.

Die Wechselwirkung zwischen entgegengesetzt geladenen Ionen zählt dabei zu den stärksten nichtkovalenten Wechselwirkungen. Ihre Energie wird über das Coulomb-Gesetz entsprechend Gl. 2-1 beschrieben. Es handelt sich um eine sehr weitreichende, nicht gerichtete Kraft, welche umgekehrt proportional zum Abstand  $r$  ist. Sie ist stark abhängig von der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  des Lösemittels, wobei hohe  $\epsilon$ -Werte die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat schwächen.

$$E = \frac{Q_1 Q_2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r^2} \quad \text{Gl. 2-1}$$

Eine ebenfalls gerichtete, jedoch etwas schwächere Bindungsenergie liefert die Ionen-Dipol-Wechselwirkung. Ein typisches Beispiel stellt ein Na<sup>+</sup>-18[Krone]-6-Komplex dar, wobei Na<sup>+</sup> als geladenes Ion mit der entgegengesetzten Partialladung der Sauerstoffe wechselwirkt.

Einen Spezialfall stellen die Wasserstoffbrückenbindungen dar. Sie bestehen aus einem Donor, bei welchem es sich um ein H-Atom handelt, welches an einem elektronegativeren Atom wie Stickstoff, Sauerstoff oder Fluor gebunden ist und einem Akzeptor mit mindestens einem freien Elektronenpaar. Diese Kraft zwischen H-Atom und Akzeptor ist bei schwachen elektrostatischer Natur, richtungs- und winkelabhängig. Diese Eigenschaften führen zu einer hohen Spezifität bei der Ausbildung von Komplexen und machen die Wasserstoffbrückenbindungen zu einer bedeutenden Größe in der Supramolekularen Chemie. In wässrigen Medien jedoch konkurrieren die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Rezeptor und Substrat mit Wassermolekülen, welche ihrerseits H-Donoren und -Akzeptoren darstellen. Dennoch sind Wasserstoffbrückenbindungen in biologischen Prozessen höchst präsent und entscheidend z. B. für die Ausbildung der Sekundärstruktur von Proteinen und Nucleinsäuren. Dies wird ermöglicht durch die Ausbildung hydrophober Mikroumgebungen, in denen kaum Wassermoleküle vorhanden sind.

Eine weitere schwache nichtkovalente Wechselwirkung ist die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung, welche zwischen Alkali- bzw. Erdalkalimetallen und C=C-Doppelbindungen auftritt. Zum Beispiel beträgt die Bindungsenergie von  $K^+$  mit Benzol in der Gasphase etwa  $80 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Auch die Kation- $\pi$ -Wechselwirkung spielt eine wichtige Rolle in biologischen Systemen und führte zu einer umfangreichen Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Seitenketten kationischer Aminosäuren (Arg, Lys oder protoniertes His) und aromatischen Seitenketten.<sup>18</sup>

Seit kurzer Zeit werden auch anziehende Wechselwirkungen zwischen Anionen und v. a. elektronenarmen Aromaten untersucht. *Kochi et al.* hat z. B. gezeigt, dass Anionen mit 1,2,4,5-Tetracyanobenzol stabile Komplexe mit Assoziationskonstanten in einem Bereich zwischen  $1$  und  $10 \text{ M}^{-1}$  aufweisen. Entscheidend ist hier auch die Größe der jeweiligen Anionen. Außerdem konnten Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass das Anionen eher seitlich zur  $\pi$ -Elektronenwolke positioniert ist.

Aromatische-Wechselwirkung, auch  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen genannt, treten zwischen aromatischen Ringen auf. Diese sind besonders ausgeprägt zwischen elektronenreichen und elektronenarmen Aromaten. Hier gibt es zwei mögliche Orientierungen der Aromaten zueinander, da eine parallele Anordnung zu einer Abstoßung des negativ geladenen  $\pi$ -Systems führen würde (Abb. 2-3). Face-to-face  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen z. B. zwischen den Nucleobasen helfen die DNA-Doppelhelix zu stabilisieren. Edge-to-face  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen können dagegen eher als eine schwache Form einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem leicht elektronenarmen Wasserstoffatom eines Aromaten und der elektronenreichen  $\pi$ -Wolke des anderen Aromaten betrachtet werden.

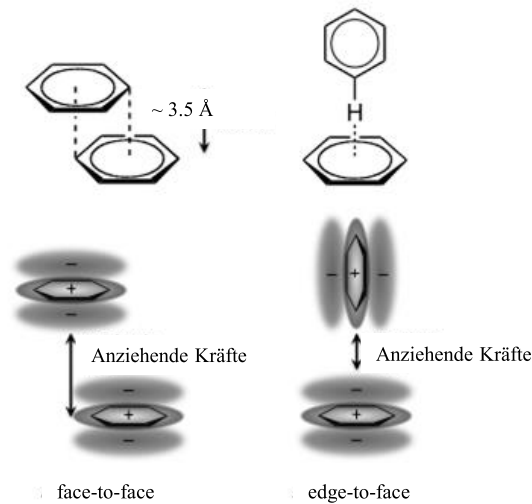


Abb. 2-3 Zwei unterschiedliche Orientierungen der Aromaten zur Ausbildung von  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen aufgrund ihrer elektronischen Struktur als Quadrupol.

Bei den Dipol-Dipol Wechselwirkungen handelt es sich um gerichtete Wechselwirkungen zwischen zwei Dipolen, wobei hier verschiedene Orientierungen denkbar sind. Bei der ersten orientieren sich die beiden Dipole senkrecht zueinander und bilden so eine einzige Wechselwirkung zwischen entgegengesetzt geladenen Partialladungen aus. Oder sie orientieren sich parallel zueinander, so dass die entgegengesetzten Partialladungen übereinander angeordnet sind und so zu zwei Wechselwirkungen führen.

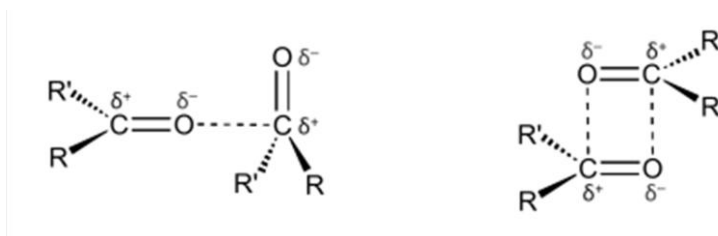


Abb. 2-4 Zwei mögliche Orientierungen der Carbonyl-Gruppen zur Ausbildung von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen.

Auch zwischen ungeladenen Molekülen kann es aufgrund von Schwankungen der Ladungsdichte und damit temporär gebildeten Dipolen zu Wechselwirkungen kommen. Diese wiederum induzieren Dipole in benachbarten ungeladenen Teilchen und binden dann untereinander Van-der-Waals-Wechselwirkungen aus. Die Stärke dieser Kräfte nimmt mit der Oberfläche der involvierten Moleküle zu. Diese Kräfte sind wenig spezifisch jedoch in ihrer Summe auch nicht zu vernachlässigen.

Wie bereits erwähnt, sind neben den gebildeten Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat auch Lösemittelleffekte zu berücksichtigen. Zur Komplexbildung muss zunächst sowohl die Solvathülle des Rezeptors als auch des die Substrates aufgebrochen werden. Hierzu ist die sogenannte Desolvatationsenergie erforderlich. Weiterhin ist bei hydrophoben

Systemen ein weiterer Effekt zu beachten, welcher auch in der Natur eine wichtige Rolle spielt, der hydrophobe Effekt. Generell kann man den Einfluss des Lösemittels auf die Komplexbildung in einen enthalpischen und einen entropischen Energiebeitrag unterteilen. Ein in Wasser gelöster Rezeptor wird in seiner meist hydrophoben Kavität wenige Wassermoleküle beherbergen, weil eine Wechselwirkung der Wassermoleküle mit den hydrophoben Seitenwänden energetisch ungünstig ist. Sobald das Substrat das in dem Hohlraum befindliche Wasser entsprechend Abb. 2-5 verdrängt, können die Wassermoleküle ihrerseits miteinander wechselwirken. Da dies energetisch günstiger ist als die Wechselwirkung mit der hydrophoben Kavität, ist die Bildung des Komplexes enthalpisch begünstigt.

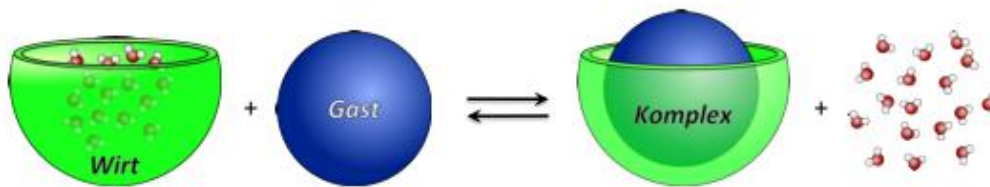


Abb. 2-5 Rezeptor mit geordnetem Wasser (enthalpisch ungünstig) wechselwirkt mit einem Substrat unter Freisetzung der Wassermoleküle (enthalpisch und entropisch günstig).<sup>15</sup>

Der entropische Beitrag kommt durch den unterschiedlichen Ordnungsgrad des Lösemittels im Rezeptor verglichen mit dem im Umgebungswasser zustande. Die Wassermoleküle im Hohlraum sind wesentlich geordneter, was zu einer Erhöhung der Entropie führt, wenn diese Moleküle durch das Substrat aus dem Rezeptor verdrängt werden. Dieser Entropiegewinn verringert die Freie Energie  $\Delta G$ , was zu einer Stabilisierung des gebildeten Komplexes führt. Die Natur macht sich den hydrophoben Effekt sowohl bei der Faltung der Proteine als auch bei der Stabilisierung der DNA-Doppelhelix zunutze. So beruhen diese beiden Vorgänge zu einem Großteil auf der Triebkraft, hydrophobe Teile eines Moleküls in Wasser miteinander wechselwirken zu lassen. Zwar nimmt die Entropie durch die Faltung des Proteins bzw. der DNA ab, jedoch überwiegt der Entropiegewinn im umgebenden Wasser, wodurch die Faltung ohne weitere Energiezufuhr abläuft.

Nach dieser kurzen Einführung der thermodynamischen Aspekte einer Komplexbildung zwischen Rezeptor und Substrat werden in den nächsten Kapiteln die Grundideen für die in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren und Substrate vorgestellt.

## 2.2 SYNTHETISCHE REZEPTOREN ZUR BINDUNG VON OXO-ANIONEN

Als „a full member of the field of supramolecular chemistry“ bezeichnete Jean-Marie Lehn 1992 die beachtlichen Entwicklungen im Bereich der nichtkovalenten Koordinationschemie von Anionen. Sie kann zurückdatiert werden auf 1968 als C. H. Park und H. E. Simmons von sogenannten Katapinanden berichteten, welche Halogenid-Ionen innerhalb einer bicyclischen Kavität binden (Abb. 2-6).<sup>19</sup> Dies konnte später durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt werden.

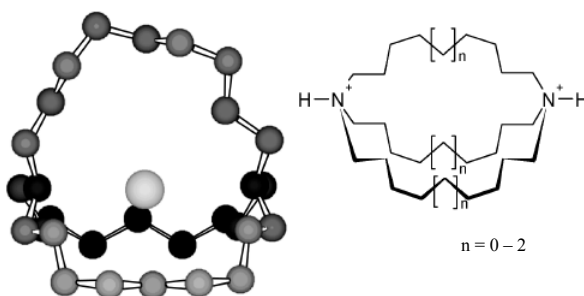
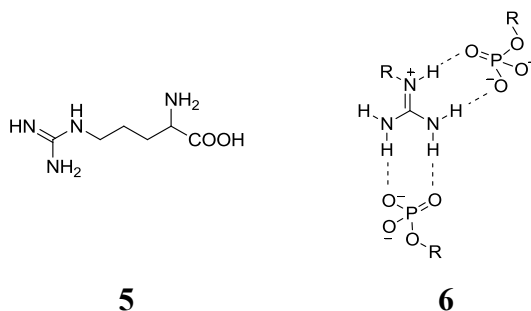


Abb. 2-6 Minimisierte Struktur eines Chloridkomplexes mit 1,11-Diazabicyclo[9.9.9]nonacosan, Katapinand  $n = 1$  (links), allgemeine Struktur (rechts). (Copyright 2013 Wiley. Verwendet mit Genehmigung.<sup>20</sup>)

Nur wenige Monate zuvor bahnte C. Pederson mit seinen bahnbrechenden Untersuchungen zur Kation-Bindung von Dibenzo[18]Krone-6 den Weg zur heutigen Supramolekularen Chemie. Oxo-Anionen sind in unserer Umgebung allgegenwärtig, wie z. B. Carbonate, Phosphate und Silikate, welche die Hauptanionen in biomineralisierten Materialien, wie den Knochen darstellen. In biochemischen Prozessen dienen sie als Substrate oder Cofaktoren für Enzyme, wie z. B. die Phosphatreste in ADP und ATP, welche nichtkovalent an ATPase Enzyme als Teil des Energietransports der Atmungskette binden. Von spezieller Bedeutung unter der Bindungsstellen für Anionen in Proteinen und Enzymen ist die Aminosäure Arginine (**5**), welche eine Guanidinium-Gruppe enthält. Guanidinium stellt eine herausragende Bindungsstelle für Anionen dar, da es über einen großen pH-Bereich protoniert vorliegt und mit Carboxylaten, Phosphaten, Sulfaten etc. mehrfache Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann oder z. B. im sogenannte *Arginine-Fork-Motiv* **6** sogar mit zwei Anionen gleichzeitig eine Wechselwirkung eingeht.



5

6

Hierbei sind neben den ionischen Wechselwirkungen auch mehrfach ausgebildete Wasserstoffbrückenbindungen von großer Bedeutung, damit eine stabile supramolekulare Komplexierung in protischen Lösemitteln wie Wasser stattfinden kann.

Durch die Arbeiten von C. Schmuck wurde 1999 ein neues Bindungsmotiv für Carboxylate in wässrigen Systemen entwickelt, die Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptoren (schematische Darstellung Abb. 2-7).<sup>6</sup> Durch eine schrittweise Optimierung der Bindungseigenschaften eines Guanidins durch die gezielte Einführung weiterer Bindungsstellen für nichtkovalente Wechselwirkungen wurden Rezeptoren erhalten, die nicht nur einfache Carboxylate, sondern z. B. auch einzelne Aminosäuren oder Tetrapeptide stereoselektiv binden können.<sup>4,21–24</sup>

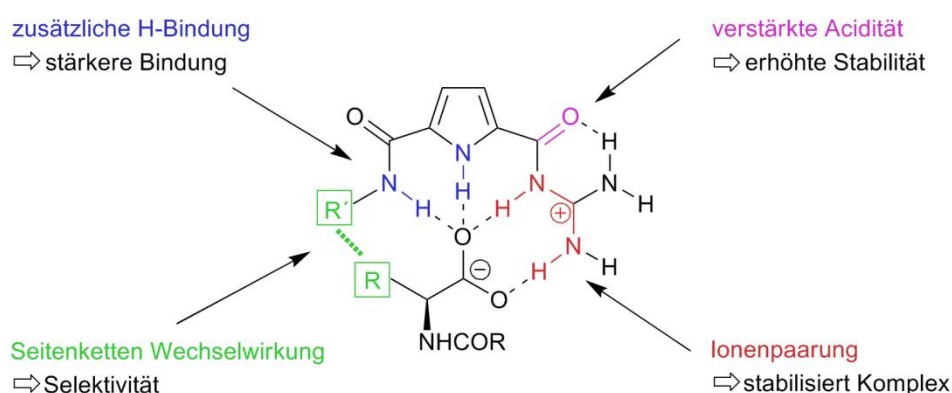


Abb. 2-7: Bindungsmodus des Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptors nach Schmuck.

Die Bindungsstärke des Bindungsmotivs beruht zum einen auf Coulomb-Wechselwirkungen zwischen dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Kation und einem Carboxylat-Anion. Durch die Acylierung der Guanidinium-Gruppe erhöht sich deren Acidität auf ungefähr 6 - 7 und verstärkt dadurch die Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden. Eine experimentelle thermodynamische Vergleichsstudie mit einer Reihe von strukturell verwandten Guanidiniocarbonylpyrrolen zeigte, dass sich die energetischen Beiträge der einzelnen nichtkovalenten Wechselwirkungen deutlich unterscheiden. Neben dem Ionenpaar können zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen vom Pyrrol-NH und Amid-NH ausgebildet werden. Das Bindungsmotiv ist geometrisch planar und damit ideal präorganisiert für eine Komplexierung eines ebenfalls planaren Carboxylats. Sekundäre Seitenkettenwechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat führen dabei zu selektiven Bindungen.<sup>25</sup> Die Eigenschaften dieser neuen Rezeptorklasse sind sowohl anhand von NMR, ESI-MS und ITC-Messungen als auch theoretisch mit Hilfe von *molecular modeling* und *ab initio* Studien gut untersucht.<sup>26–28</sup> Durch diese Kombination von mehreren Wechselwirkungen wurden z. B. Bindungskonstanten von  $K = 10^3$  bis  $10^4 \text{ M}^{-1}$  in 10 % DMSO/Wasser für *N*-Ac-



Ala-OH erreicht, was vergleichsweise sehr hohe Werte für eine Komplexierung in einem solch polaren Lösemittel sind.<sup>25</sup>

### 2.3 CALIXARENE ALS MAKROCYCLISCHE REZEPTOREN

Um hohe Affinitäten zu erreichen, sollten sich Rezeptor und Substrat über eine möglichst große Kontaktfläche berühren können. Dies ist dann gegeben, wenn der Rezeptor das Substrat so umhüllen kann, dass zahlreiche nichtkovalent bindende Wechselwirkungen zum Tragen kommen und Größe, Gestalt und Architektur des Substrates maßgeblich sind. Dies ist gut realisierbar für Rezeptoren mit intramolekularen Hohlräumen, in welche das Substrat hineinpasst und einen sogenannten Cryptat, einen Einschlusskomplex, ausbildet. Dazu zählen makrocyclische Strukturen, die groß sind und deshalb Hohlräume geeigneter Größe und Form aufweisen. Damit verfügen sie auch über zahlreiche Verzweigungen, Brücken und Verknüpfungsstellen, wodurch der Aufbau einer bestimmten Struktur mit den gewünschten dynamischen Merkmalen ermöglicht wird. Sie ermöglichen die systematische Anordnung von strukturbildenden Gruppen, Bindungsstellen und reaktiven Funktionen.<sup>16</sup> Zu diesen synthetisch bedeutenden Makromolekülen gehören polycyclische Strukturen wie Polyamine. Doch auch einfache Makrocyclen wie Kronenether, Cyclodextrine und Calixarene nutzen den makrocyclischen Effekt zur Bindung von Substraten, welcher neben der Anzahl an Bindungsstellen auch auf der Präorganisation des Rezeptors beruht.

Im Folgenden wird die Familie der Calixarene, welche auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam, in Kürze vorgestellt.

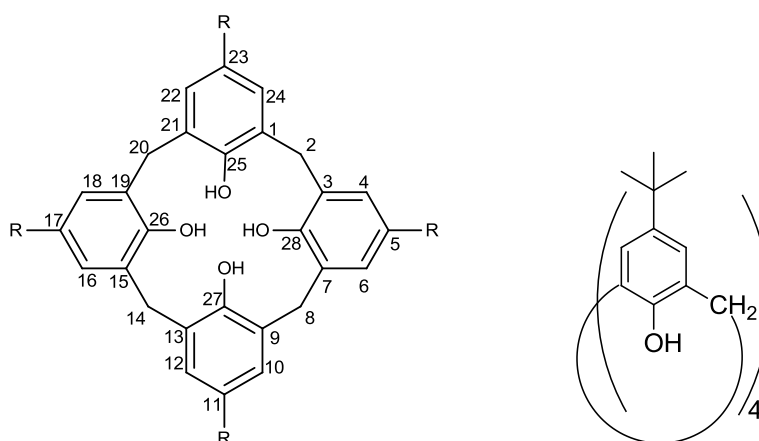


Abb. 2-8 links: Calix[4]aren mit zugehöriger IUPAC Positionsnummerierung; rechts: vereinfachte Formeldarstellung.

Calixarene gehören zur Gruppe der Metacyclophane, welche durch Kondensation von *p*-tert-Butylphenol mit Formaldehyd als cyclische Oligomere gebildet werden. Ihren Namen tragen sie durch die kelchartige Gestalt der stabilsten Konformation ihres Tetramers (latein. calix = Kelch). Sie haben eine so große Bedeutung in der Supramolekularen Chemie, da sie im Vergleich zu vielen natürlichen Substanzen, wie z. B. Polysacchariden eine klar definierte Struktur aufweisen und vielfältig funktionalisiert werden können.<sup>29,30</sup> Es sind heute Ringgrößen von 4 bis 20 Phenoleinheiten realisierbar, wobei die Tetra-, Hexa- und Octa-Derivate am häufigsten synthetisiert werden.

Die potentiellen Anwendungen reichen vom Einsatz als hochspezifische Rezeptoren für die Analytik, die Sensortechnik<sup>31</sup> und die medizinische Diagnostik über die Verwendung zur Dekontaminierung von Abwässern bis hin zur Konstruktion künstlicher Enzyme und zur Herstellung neuer Materialien für die nichtlineare Optik oder für ultradünne Schichten und Siebmembranen mit molekularen Poren. Diese große Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten erlauben erst die speziellen Eigenschaften dieser Substanzklasse. Eine davon ist die hohe Flexibilität, welche durch die Methylenbrücken gegeben ist. Calix[4]arene, welche in der *cone*-Konformation vorliegen, führen in Lösung eine Inversion durch, indem die Hydroxygruppen durch das Innere des Makrocycluses schwingen und dabei die entgegengesetzt, jedoch identische *cone*-Konformation ausbilden (siehe Abb. 2-9).

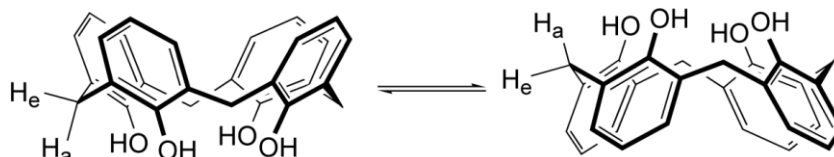


Abb. 2-9 Ringinversion eines Calix[4]arens von *cone*- zu *cone*-Konformation. Das Dublett im  $^1\text{H}$ -NMR bei tiefem Feld stammt von den axialen Wasserstoffatomen  $\text{H}_a$ , das bei höherem Feld von den äquatorialen  $\text{H}_e$ .

Die Energiebarriere für die Ringinversion lässt sich am einfachsten durch NMR-Messungen bei steigender Temperatur bestimmen. Dabei fällt vor allem das temperaturabhängige  $^1\text{H}$ -Resonanzverhalten der Methylenprotonen auf. Die beiden Dubletts werden mit steigender Temperatur breiter und koaleszieren schließlich bei der Koaleszenztemperatur  $T_c$  zu einem Singulett (siehe Abb. 2-10). Durch die Inversion wechselt jeweils für ein Proton seine Stellung von axialer zu äquatorialer Position und umgekehrt. Die notwendige Energie ist abhängig vom Lösemittel, da die cyclische Anordnung der Wasserstoffbrücken zwischenzeitlich unterbrochen oder zumindest gelockert werden muss.<sup>30</sup>

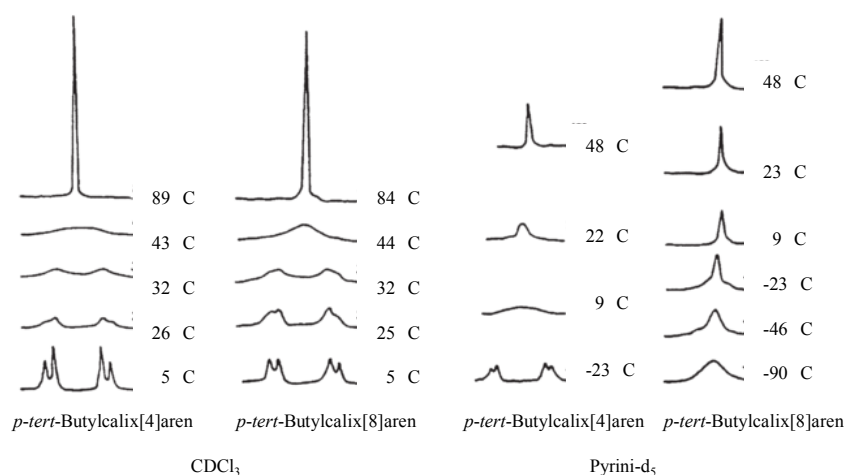


Abb. 2-10 Temperaturabhängige Betrachtung der Methylenprotonen in  $p$ -tert-Butylcalix[4]aren und  $p$ -tert-Butylcalix[8]aren in einem unpolaren und polaren Lösemittel. Die Energiebarriere für die Ringinversion für  $p$ -tert-Butylcalix[4]aren ist z. B. in  $\text{CDCl}_3$ :  $\Delta G = 15.7 \text{ kcal/mol}$  bei  $T_c = 52 \text{ }^\circ\text{C}$ , in Pyridin- $\text{d}_5$ :  $\Delta G = 13.7 \text{ kcal/mol}$  bei  $T_c = 15 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Die Substituenten in *para*-Position zeigen dabei kaum einen Einfluss auf die Rotationsbarriere. Dagegen zeigen sich deutliche Unterschiede mit zunehmender Ringgröße. Der Mechanismus dieser Umwandlung von *cone* nach *cone* ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Denkbar sind hier zwei Grenzfälle. Der erste beinhaltet eine konzertierte Inversion mit nur einem Übergangszustand, wohingegen der zweite eine schrittweise Umwandlung in den Stufen *cone* *partial-cone*, *1,3-alternate* oder *1,2-alternate*, *partial-cone*, *cone* durchläuft (siehe dazu Abb. 2-11). Moleküldynamische Computersimulationen weisen auf *partial-cone*- und *alternate*-Konformationen als mögliche Zwischenstufe hin.<sup>32</sup> Werden sperrige Substituenten eingesetzt, wird die Inversion blockiert und die verschiedenen Konformere werden fixiert. Bei Calix[4]arenen sind vier unterschiedliche Konformationen möglich, die durch geeignete Synthesestrategie auch eingestellt werden können. Mischungen mehrerer Konformere lassen sich sehr schwer trennen und sollten umgangen werden. Dieser flexible oder in einer Konformation fixierte Grundkörper des Calixarenes eröffnet verschiedene Möglichkeiten einer Präorganisation von Liganden.

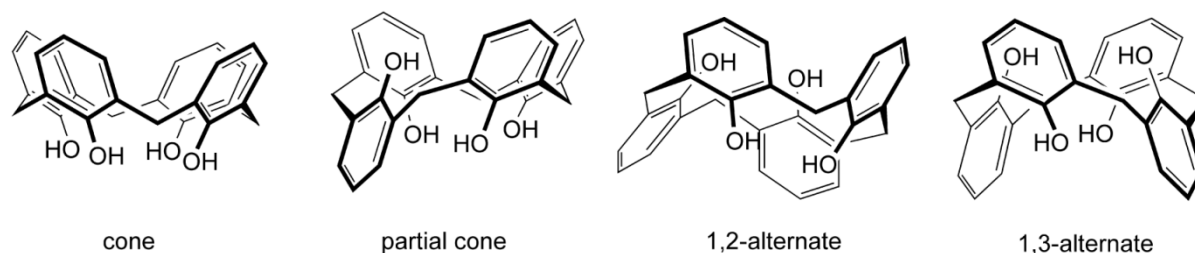


Abb. 2-11 Mögliche Konformere eines Calix[4]arens.

Eine weitere Besonderheit von Calixarenen ist ihre strukturbedingte Kombination verschiedenartiger Bindungseinheiten, die gleichzeitig Substrate über kationische, anionische und neutrale Stellen binden können. Dabei wird von elektrostatischen und Van-der-Waals-Kräften sowie solvophoben Effekten Gebrauch gemacht.

### 2.3.1 Amphiphile Calixarene bilden Micellen aus

Micellen sind nicht kovalent gebundene, meist sphärische Aggregate, die spontan von amphiphilen Molekülen beim Überschreiten einer kritischen Micellenbildungskonzentration (KMK) in Wasser oder organischen Lösemitteln gebildet werden. Auch Calixarene stellen Amphiphile dar, wobei die Hydroxygruppen am *lower rim* die polare Kopfgruppe und das aromatische Grundgerüst den lipophilen Teil darstellen. Diese Eigenschaft kann noch verstärkt und kontrolliert werden, indem die verschiedenen Anteile durch Funktionalisierung intensiviert und gerichtet werden. *Böttcher et al.* konnten erstmals ein amphiphiles Dendrocalixaren **7** synthetisieren, welches spontan zu vollkommen einheitlichen und strukturpersistenten Micellen aus je sieben Molekülen in wässriger Lösung aggregiert. Dabei gelangen durch die Einführung von gerichteten Wechselwirkungen der Kopfgruppe zum ersten Mal eine dreidimensionale Strukturcharakterisierung einer Micelle in molekularer Größenordnung.<sup>33</sup>

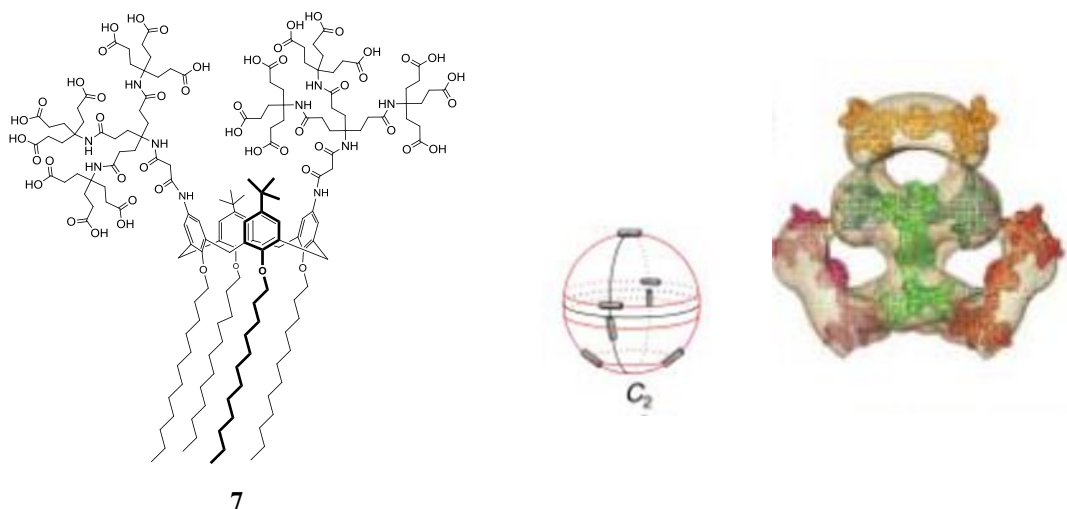


Abb. 2-12 C<sub>2</sub>-symmetrische Anordnung der sieben Calixarenkopfguppen in einer berechneten Dichtekarte; die unpolaren Reste wurden nicht abgebildet. 2x2 Moleküle (hellgrün / dunkelgrün und auf der Rückseite: türkis / blauviolett) ordnen sich als Dimere an und liegen einander gegenüber. (Copyright 2013 Wiley. Verwendet mit Genehmigung.<sup>33</sup>)

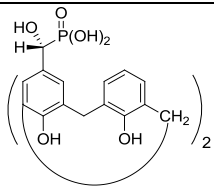
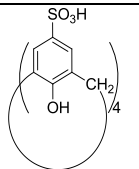
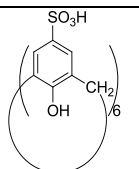
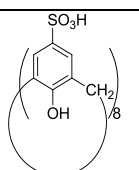
Die T-Form von **7** induziert dabei eine spezifische Faltung, die zur Bildung von Aggregaten mit sehr starker Krümmung führt. Es ist erwiesen, dass die hydrophoben Ketten von Amphiphilen in supramolekularen Aggregaten zu ungeordneten Orientierungen neigen.<sup>34</sup> Die

Kopfgruppen sind dabei über die Micellenoberfläche verteilt. Außerdem verringert die spezifische Anordnung geladener Kopfgruppen die Flexibilität innerhalb des Aggregats, z. B. durch Wasserstoffbrücken, die durch das Lösemittel vermittelt werden. Durch die gerichteten Wechselwirkungen der Kopfgruppen wird ein definiertes Strukturmuster mit charakteristischer Gestalt stabilisiert. Demgegenüber führen nicht gerichtete Wechselwirkungen bei klassischen Detergensmicellen zu einer eher flüssigkeitsähnlichen Organisation.

Amphiphile auf der Basis von Calixarenen werden seit kurzem intensiv untersucht und haben bereits außerordentliche Fähigkeiten durch Selbstassemblierung und molekularer Erkennung gezeigt. Damit haben sie einen bedeutenden Platz im Bereich des Wirkstofftransports und der Bionanotechnologie eingenommen.<sup>35–39</sup>

### 2.3.2 Erkennung von Aminosäuren durch wasserlösliche Calixarene

Das Calixarene-Grundgerüst ist bekannt für seine Fähigkeiten, sowohl neutrale als auch geladene Substrate einzuschließen. Zu den häufig untersuchten geladenen Spezies gehören quartäre Ammoniumionen oder Guanidiniumionen, welche auch in den Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin vorzufinden sind. Daraus ergaben sich schließlich eine Anzahl bemerkenswerter Studien mit dem Ziel, Calixarene als potentielle Rezeptoren für Aminosäuren zu untersuchen.<sup>40–43</sup> Hier wurden vor allem Derivate der *p*-Sulfonato-calix[*n*]arene und Phosphonato-calix[*n*]arene auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Einschlusskomplexe mit verschiedenen biologischen Substanzen in Wasser zu bilden. Dieses hohe Interesse erzielten sie nicht nur durch ihre Wasserlöslichkeit, sondern auch aufgrund einer Anzahl von potentiellen biologischen und medizinischen Anwendungen, welche zu Patenten führten.<sup>44,45</sup> Coleman *et al.* und Atwood *et al.* veröffentlichten dazu in kürzlich erschienenen Reviews Bindungskonstanten, welche durch Mikrokalorimetrie, NMR-Spektroskopie, UV-Spektroskopie und RP-HPLC Messungen für die Komplexierung von Aminosäuren, Di- und Tripeptiden mit Calixarenen und ihren Derivaten bestimmt wurden.<sup>46</sup> Zusammenfassend erbrachten die Ergebnisse, dass die Einschlussfähigkeiten des Rezeptors mit seinem strukturellen Aufbau korrelieren. Elektrostatische Wechselwirkungen wurden z. B. zwischen *p*-Sulfonato-calix[*n*]arenen und basischen Aminosäuren, wie Arginin und Lysin gefunden. Auch die äußeren Einflüsse, wie das Lösemittel und der pH-Wert spielen eine bedeutende Rolle. Die Einführung einer Methylengruppe am *upper rim* zwischen Aromat und funktioneller Gruppe verringerte die Bindungskonstante deutlich.

	Rezeptor	Substrat	Methode pH	Komplex	K / M <sup>-1</sup>	Lit.
<b>8</b>		Lys	UV MeOH	2:1	740	<sup>47</sup>
<b>9</b>		Gly	NMR 8	1:1	30	<sup>48</sup>
		Lys	NMR 8	1:1	1360	<sup>48</sup>
		Lys-Lys	NMR	1:1	3400	<sup>48</sup>
<b>10</b>		Lys	NMR 8	1:1	2200	<sup>48</sup>
		Lys-Lys	ITC	1:1 1:2*	2300 700	<sup>48</sup>
<b>11</b>		Lys	NMR 8	1:1	2100	<sup>48</sup>

Tab. 2-2 Beispielhafter Ausschnitt einiger Bindungsstudien verschiedener Calixarene mit Aminosäuren (\*mehrere Ergebnisse durch unterschiedliche Bedingungen).<sup>46</sup>

Thermodynamische Untersuchungen von Rezeptor **9** und **10** mit Di- und Tripeptiden v. a. mit Lysin und Arginin haben gezeigt, dass die Komplexbildung durch den Einschluss des Peptides in die Kavität des Rezeptors durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen enthalpisch begünstigt wird. Auch die Entropie ist zu beachten, da eine Desolvatation der geladenen Gruppen stattfindet. Die Stabilität steigt mit der Anzahl der möglichen Bindungsstellen und somit konnten für die Di- und Tripeptide Assoziationskonstanten bis zu  $4.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  bestimmt werden. Eine Selektivität von  $\text{Arg} > \text{Lys} > \text{andere Aminosäuren}$  wird auch im Peptid beibehalten. Weitere Untersuchungen erbrachten die Bedeutung von Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den geladenen Seitenkette und den Aromaten. Neben 1:1-Komplexen wurden bei diesen Untersuchungen auch Komplexe anderer Stöchiometrie gefunden, z. B. der Einschluss von zwei Aminosäuren bei den größeren Calixarenen aber auch 2:1-Komplexe für Verbindung **8** aus zwei Rezeptoren und einem Substrat. *Suwinska et al.* gelang die Darstellung von kristallinen Komplexen aus funktionalisierten wasserlöslichen Calixarenen und Substraten, wie Amine, Aminosäuren und verschiedene „Wirkstoffe“.<sup>49</sup>

Neben diesen *p*-Sulfonato- und *p*-Phosphonato-calix[n]aren-Derivaten ist natürlich eine Vielzahl weiterer Funktionalisierungen denkbar, darunter haben sich peptidische Liganden hervorgetan, welche eine große Variation an Polaritäten oder sogar das Auftreten von Chiralitätszentren erlauben. Einige Beispiele werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Mit den Erkenntnissen, welche durch die Komplexierung von Aminosäuren und auch Oligopeptiden gewonnen wurden, wurde schließlich auch die Erkennung von Proteinoberflächen in Angriff genommen.

### 2.3.3 Erkennung von Proteinoberflächen durch synthetische Calixaren-basierte Moleküle

Calixarene werden gerne als Grundgerüst für die Synthese von multivalenten Rezeptoren eingesetzt, weil sie mehrere reaktive Positionen zur Funktionalisierung vorweisen und zudem durch definierte konformative Eigenschaften sehr variabel sind. Ihre Besonderheit ist auch eine hydrophobe Kavität, welche kleine Substrate einschließen kann. Dadurch fanden Calixarene bereits als Grundgerüst ihren Platz in Studien z. B. zur Erkennung und Inhibierung von Lectinen<sup>50</sup>, DNA-Kondensation und Zelltransfektion, Proteinoberflächenenerkennung<sup>51</sup>, Selbstassemblierung und Anwendungen auf dem rapide wachsenden Gebiet der Nanotechnologie (siehe Abb. 2-13).

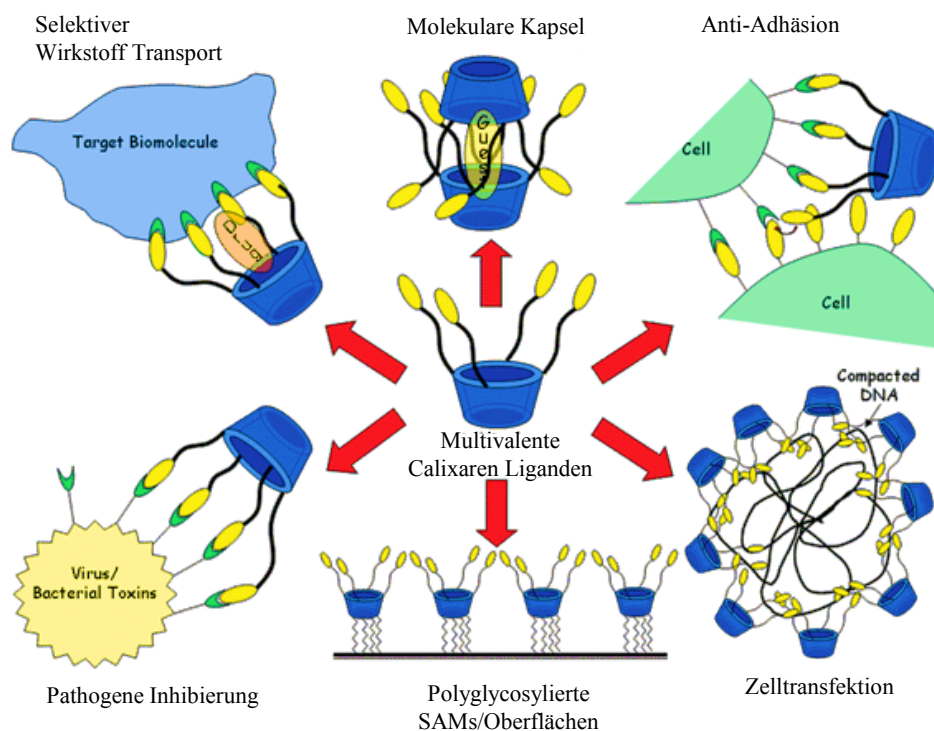


Abb. 2-13 Schematische Übersicht über einige Anwendungen von multivalenten Calixarenen als Rezeptoren in der Bionanotechnologie.<sup>52,53</sup> (Copyright 2013 Wiley. Verwendet mit Genehmigung.<sup>53</sup>)

Dieses enorme Potenzial basiert v. a. auf dem Konzept der Multivalenz. Mit ihr lassen sich die außergewöhnlich hohen Affinitäten in biologischen Systemen erklären. Die Bindungspartner bilden dabei kooperativ multiple Wechselwirkungen aus, die auf einzelnen schwachen, nichtkovalenten Bindungen basieren und daher prinzipiell reversible sind. Die Valenz ist deshalb die Anzahl der Funktionalitäten eines Typs, welche über einen Linker an einem Grundgerüst fixiert sind (siehe Abb. 2-14).

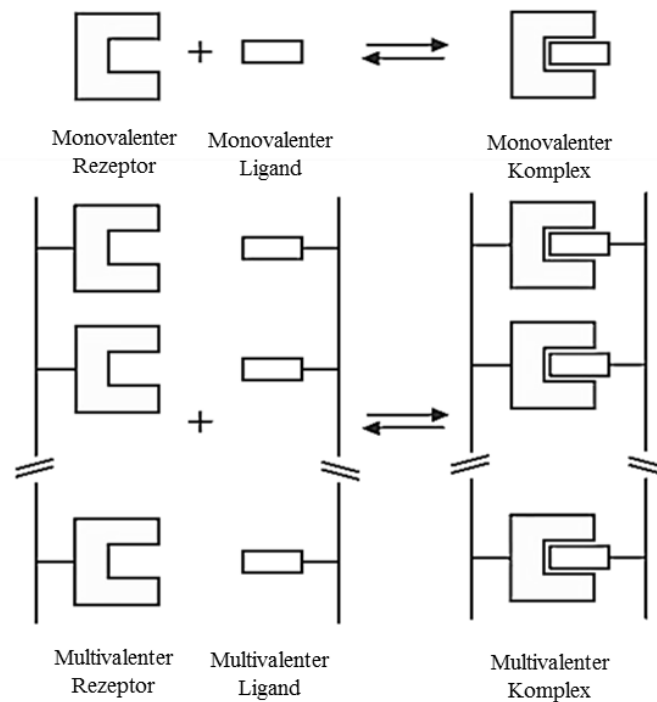


Abb. 2-14 Schematische Darstellung einer Komplexbildung zwischen einem monovalenten Rezeptor und einem monovalenten Substrat (oben) im Vergleich zu der Wechselwirkung zwischen einem multivalenten Rezeptor mit seinem multivalenten Substrat (unten).

Multivalente Wechselwirkungen führen zu hohen Spezifitäten und thermodynamischer und kinetischer Bindungsverstärkung. Dies wird für eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie z. B. für Erkennungs-, Adhäsions- und Signalprozesse genutzt.

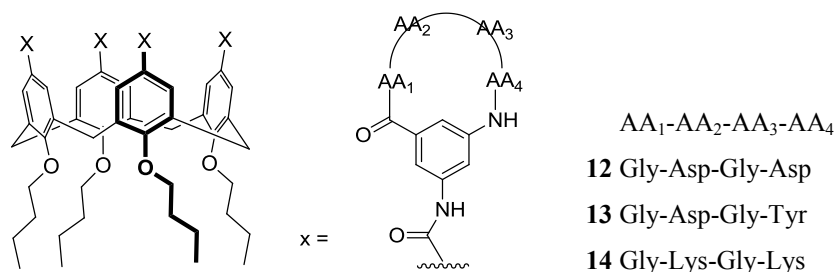
Und genau diese Fähigkeit zur Ausbildung multivalenter Komplexe macht die Calixarene zu vielversprechenden Grundgerüsten für Liganden zur Erkennung von Protein-Oberflächen.

Ein Protein besitzt in seiner natürlich gefalteten Konformation eine lösemittel exponierte und eine lösemittel abgewandte Oberfläche. Aktive Zentren von Enzymen finden sich meist im Innern und weisen deshalb eine konvergente Anordnung ihrer funktionellen Gruppen auf, was es auch niedermolekularen Molekülen ermöglicht, als Inhibitoren zu wirken. Dagegen zeigen die funktionellen Gruppen auf der äußeren Seite des Proteins eine divergente Ausrichtung. Soll ein Rezeptor diese Oberfläche erkennen, muss er zunächst oberflächengebundenes Lösemittel verdrängen und außerdem eine möglicherweise sehr komplexe



Oberflächentopologie komplementär ergänzen. Eine starke Bindung erfordert eine Erkennung von großen Flächen und deshalb multifunktional weitverzweigte Rezeptoren.<sup>43</sup>

*Hamilton et al.* synthetisierten polyvalente Peptidocalixarene mit dem Ziel verschiedene Proteinoberflächen zu erkennen und damit klinisch wichtige Protein-Protein-Interaktionen zu inhibieren.<sup>54</sup> Sie bestehen aus einem Calix[4]aren als Grundgerüst, welches von vier cyclischen Tetrapeptiden umgeben ist (**12** - **14**). Dieses Design orientiert sich an verschiedenen Protein-Protein-Grenzflächen, welche dadurch charakterisiert sind, dass eine hydrophobe Region von polaren, geladenen und Wasserstoffbrücken-ausbildenden Resten umgeben ist. Durch eine Variation der eingesetzten Aminosäuren wurden strukturabhängige Selektivitäten zu verschiedenen Proteinen, welche zum Teil auch *in vivo* untersucht wurden, gefunden.



Zum Beispiel wurde der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) als Target gewählt, da er eine Rolle bei der Embryogenese, der Zellproliferation, der Wundheilung sowie der Angiogenese spielt und im Verdacht steht, Krebs auszulösen. Dabei ist eine auftretende Wechselwirkung des PDGFs mit seinem Rezeptor GPGFR von großer Bedeutung. Diese Interaktion soll durch synthetische, niedermolekulare Moleküle verhindert werden und damit gegebenenfalls ein Zugang zu neuen Therapeutika ermöglicht werden. Die Calixarene **12** - **14** wurden dazu als Antagonisten gegen PDGF-induzierte PDGFR Autophosphorylierung in mehreren Assays evaluiert. Dabei zeigt **13** einen sehr niedrigen IC<sub>50</sub>-Wert von 250 nm. Anhand einer Affinitätselektrophorese wurde die Wechselwirkung von **13** mit PDGF eindeutig nachgewiesen.<sup>54</sup> Weiterhin gab eine konzentrationsabhängige Verdrängung von <sup>125</sup>I-PDGF aus PDGFR Hinweise darauf, dass seine Bindung zu einer Auflösung der PDGF-PDGFR-Bindung führt. Zell-basierte Studien zeigten auch, dass **13** Antitumor- und Antiangiogenese-Wirkung auf menschliche Tumore in Mäusen hat.

Eine weitere Anwendung von **12** wurde von *Wei et al.* berichtet, wobei unter Detektion mit Hilfe einer Fluoreszenztitration die Bindung von Cytochrom c (Cyt<sub>c</sub>) mit der Cytochrome c Peroxidase (Cyt<sub>c</sub>P) blockiert wurde. Dabei ersetzt **12** Cyt<sub>c</sub>P und formt einen 1:1-Komplex mit Cyt<sub>c</sub> mit einer Assoziationskonstant  $K_{\text{Ass}}$  von  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .<sup>55</sup>

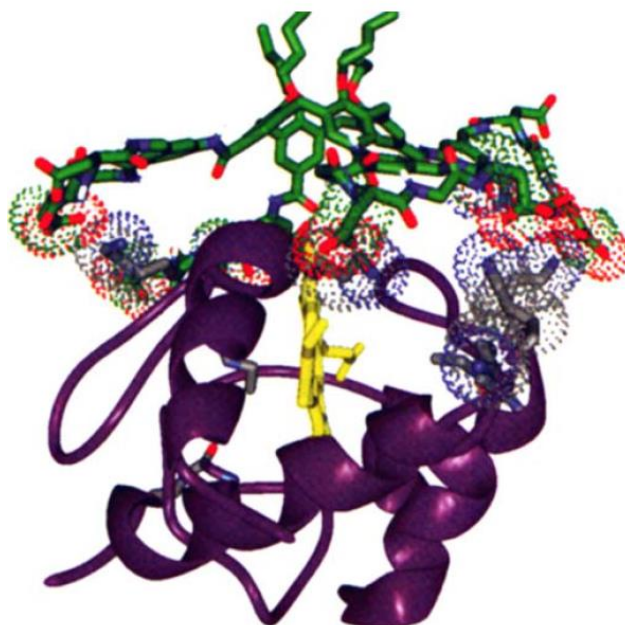


Abb. 2-15 Vorgeschlagene Struktur eines 1:1-Komplexes aus Cyt<sub>c</sub> und **12**. (Copyright 2013 Wiley. Verwendet mit Genehmigung.<sup>51</sup>)

*Cunsolo et al.* verwendeten das größere und flexiblere Calix[8]aren-Derivat und funktionalisierte es mit acht Aminosäuren, welche komplementär zur Oberfläche der Tryptase nahe des aktiven Zentrums sind.<sup>56</sup>

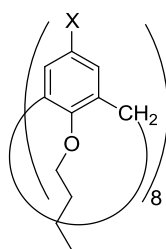
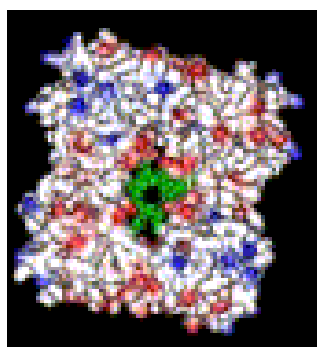


Abb. 2-16 Links: Oberfläche der Kristallstruktur der Tryptase (PDB 1A0L) und das Calix[8]aren-Derivat mit  $X = \text{NHLys}$  als grünes CPK-Modell. Rechts: Alle gemessenen Inhibitoren der Tryptase rHT. (Copyright 2013 Elsevier. Verwendet mit Genehmigung.<sup>56</sup>)

Das aktive Zentrum der Tryptase ist umgeben von vier negativen Ladungen, was es zu einem idealen Target für einen komplementären multifunktionalen Rezeptor mit positiver Ladung macht. Das Ziel ist es, die aktive Region des Proteins und damit den Zugang für ein Substrat

zu blockieren. Kinetische Analysen zur Inhibierung mit rekombinanter humaner Tryptase (rHT in *Pichia pastoris*, Heparin-frei) zeigten eine zeitabhängige kompetitive Inhibierung im nanomolaren Bereich.<sup>56</sup>

Neri *et al.* haben eine kleine Bibliothek von *N*-Tetrakis(tetrapeptido)Calix[4]arenen synthetisiert, wobei ein Calixaren-Grundgerüst mit je vier linearen Tetrapeptiden am *upper rim* funktionalisiert wurde. Diese wurde auf ihr Inhibierungspotential von Transglutaminase hin untersucht.<sup>53</sup> Transglutaminasen (TGs) sind Enzyme, die den Acyltransfer zwischen der  $\gamma$ -Carboxyl-Gruppe einer proteingebundenen Glutaminsäure und einer primären Aminogruppe eines proteingebundenen Lysins katalysiert. TGs, welche normalerweise in kleinen Konzentrationen in vielen Gewebearten vorhanden sind, werden bei verschiedenen Krankheiten, wie der Sprue (Zöliaki) oder Huntington aktiviert oder überexprimiert. Dadurch ist das Interesse hoch, TG-Inhibitoren als neue potentielle Therapeutika zu finden.



Abb. 2-17 Schematische Darstellung des Rezeptors mit TG als Target. (Copyright 2013 Elsevier. Verwendet mit Genehmigung.<sup>57</sup>)

Beim Design des Peptidocalixarenes **15**, wurde ein Calix[4]aren gewählt, welches in der *cone*-Konformation durch Propylgruppen fixiert wurde. Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass die Liganden alle zur Proteinoberfläche hin orientiert sind. Die TG-Aktivität wurde durch die Aufnahme von Spermidin in *N*, *N*-dimethyliertes Casein bestimmt. Dabei zeigten sich die vollständig geschützten Substanzen als bessere Inhibitoren als teilweise oder vollständig entschützte Derivate. Eine Vergleichsmessung mit den freien Tetrapeptiden zeigte nahezu keinen Effekt, was auf eine spezifische, multivalente Bindung hinweist und die Bedeutung des Calixaren-Grundgerüsts stützt.<sup>57</sup>

Anhand dieser Beispiele zeigt sich das Potential eines Calixaren-basierten Rezeptors zur multivalenten Erkennung von Proteinoberflächen.

## 2.4 BINDUNGSSTUDIEN ZUR UNTERSUCHUNG VON REZEPTOR-SUBSTRAT-KOMPLEXEN

In dieser Arbeit wurden verschiedene biologisch relevante Moleküle wie Aminosäuren, Nucleotide, Nucleinsäuren und die ATPase P97 auf ihre Bindungseigenschaften mit synthetisch hergestellten Rezeptoren untersucht. Der folgende Abschnitt soll eine kurze Einführung in die jeweiligen Eigenschaften bieten und den aktuellen Stand der Forschung auf diesem Gebiet vorstellen.

### 2.4.1 Aufbau von Nucleotiden und Nucleinsäuren und ihre molekulare Erkennung

Neben den Proteinen stellen die Nucleinsäuren eine weitere große Klasse von Biopolymeren dar. Diese lässt sich unterteilen in die Desoxyribonucleinsäure (DNA), welche die gesamte Erbinformation eines Lebewesens trägt, und die Ribonucleinsäure (RNA), welche für die Übersetzung der Erbinformation in die Aminosäuresequenz eines Proteins (Translation) zuständig ist. Die gesamte DNA wird als Genom bezeichnet, welches sich aus einzelnen Abschnitten, den Genen, zusammensetzt. Diese Gene codieren die Biosynthese der RNA (Transkription) und somit die Biosynthese von Proteinen. Die genaue Struktur der DNA wurde 1953 von *Watson* und *Crick* aufgeklärt, was ihnen 1962 den Nobelpreis für Medizin erbrachte. Beide Nucleinsäuren bestehen aus einem linearen Polymer von phosphorylierten Zuckerbausteinen, die über Phosphorsäurediesterbindungen zwischen der OH-Gruppe am C<sup>3</sup>-Atom des einen und am C<sup>5</sup>-Atom des anderen Zuckers miteinander verknüpft sind. An jedem Zuckerbaustein befindet sich am anomeren C-Atom eine  $\beta$ -N-glycosidisch gebundene aromatische Nucleobase, bei der es sich entweder um ein Pyrimidin- oder ein Purin-Derivat handelt. Die beiden Nucleinsäuren unterscheiden sich in ihrem Zuckerbaustein, welcher für das Grundgerüst (Rückgrat) verantwortlich ist, sowie in einer der vier Nucleobasen. Die DNA besteht aus den Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) und den Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T). Letztere wird in der RNA durch Uracil (U) ersetzt. Durch Glycosylierung der Nucleobasen mit Ribose, welches in der RNA vorhanden ist, werden die Nucleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin und Uridin gebildet. Die in der DNA vorkommenden Desoxynucleoside bestehen dem entsprechend aus den mit Desoxyribose glycosidisch verknüpften Nucleobasen (z. B. Desoxyadenosin, dA). Durch Phosphorylierung erhält man die Nucleotide, wobei hier grundsätzlich eine Phosphorylierung sowohl an der 5'- als auch an der 3'-OH-Gruppe erfolgen kann, aber auch Anhydride ausbilden werden können. Die 5'-Nucleotide sind nun die Bausteine der Nucleinsäuren und spielen zudem eine wichtige Rolle

als Energieüberträger, Cofaktoren für Phosphorylierungsreaktionen, Botenstoffe und Cofaktoren für Redoxreaktionen.

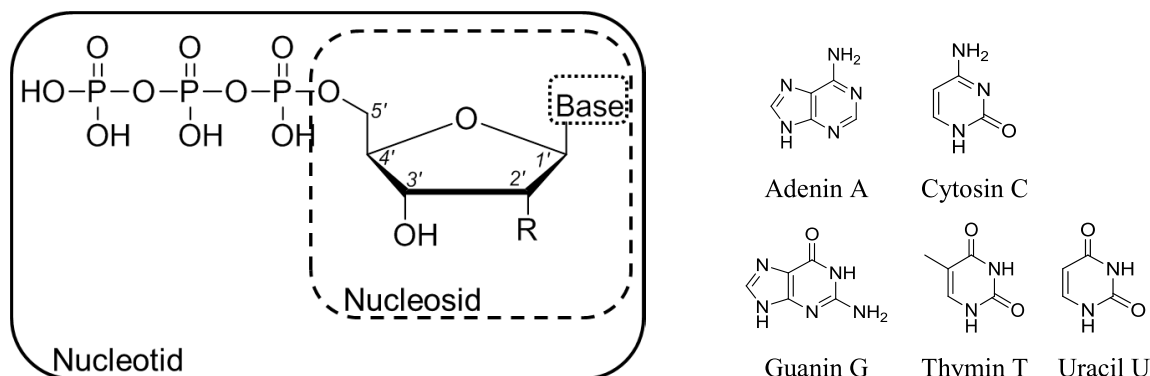


Abb. 2-18 Strukturierter Aufbau eines Nucleotids und die möglichen Nucleobasen.

Die DNA liegt als Doppelhelix vor, in der zwei DNA-Einzelstränge antiparallel zueinander angeordnet sind. Die DNA ist chemisch sehr stabil und hydrolysiert in wässriger Lösung nur sehr langsam. Unter physiologischen Bedingungen liegt die DNA in der sogenannten B-Form vor (B-DNA). Hierbei winden sich zwei Stränge umeinander und bilden eine rechtsgängige Doppelhelix aus. Die Nucleinbasen zeigen dabei nach innen und das Zucker-Phosphat-Rückgrat nach außen. Es sind hierfür nur bestimmte Basenpaarungen möglich, welche über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Dabei wechselwirkt je eine Purinbase (A, G) mit einer Pyrimidinbase (T, C). Somit kann sich Adenin nur mit Thymin paaren (A-T-Basenpaar) und Guanin nur mit Cytosin (G-C-Basenpaar). Nur in dieser komplementären Kombination („Watson-Crick-Basenpaarung“) ist die Ausbildung von Wasserstoffbrücken möglich, welche durch kooperative Effekte besonders stabil sind (Abb. 2-19).<sup>58</sup>

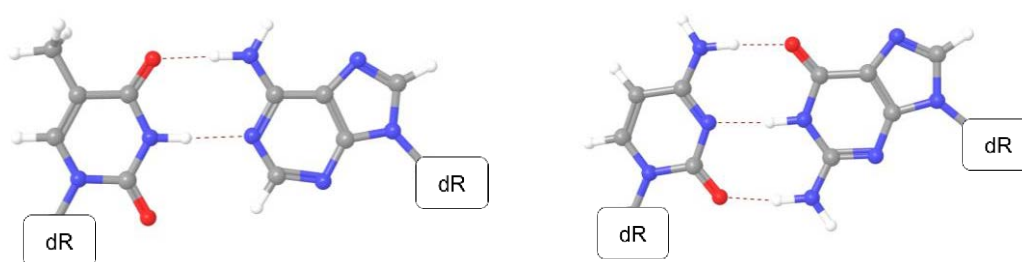
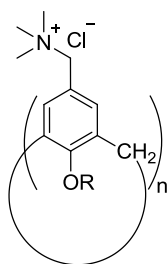


Abb. 2-19 DNA-Doppelhelix mit Watson-Crick-Basenpaarung von Adenin mit Thymin (links) und Guanin mit Cytosin (rechts). dR = Desoxyribose

Die molekulare Erkennung von Nucleotiden durch synthetische Rezeptoren, welche mit Nucleinsäuren wechselwirken, hat sich zu einer spannenden Fragestellung entwickelt. Makrocyclische protonierte Polyamine binden sehr stark an Nucleotide unter Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den

kationischen Ammoniumgruppen und den anionischen Phosphat-Gruppen.<sup>59</sup> *H.-J. Schneider et al.* untersuchten in diesem Bereich verschiedenste Rezeptoren, darunter Tetraazoniacyclophane, Aminocyclodextrine und Hexaazoniacyclophane und erzielten Bindungskonstanten bis  $10^5 \text{ M}^{-1}$  und fanden Selektivitäten zwischen verschiedenen Nucleobasen, zwischen 3'- oder 5'-substituierten OH-Gruppen oder zwischen 2'-Oxy- und Deoxynucleotiden mit Bindungskonstantendifferenzen im Bereich von einer Größenordnung. Mit diesem Hintergrund setzten *Schneider et al.* als erste Calixarene zur Erkennung von Nucleotiden und als Rezeptoren für eine DNA-Bindung ein.<sup>60</sup> Es wurden Calixarene mit (Trimethylammonium)methyl-Gruppen am *upper rim* synthetisiert.



**16** Calix[4]aren *cone*-Konformation  $R = \text{C}_3\text{H}_7$

**17** Calix[4]aren *1,3-alternate*-Konformation  $R = \text{CH}_3$

**18** Calix[6]aren

**19** Calix[8]aren

Die Assoziationskonstanten wurden mittels NMR-Titration in deuteriertem Wasser und teilweise auch durch eine kompetitive Fluoreszenztitration mit 1-Anilino-8-naphthalensulfonat (ANS) als Farbstoff erfasst. Die ermittelten freien Energien  $\Delta G$  für **16** und **16** waren ähnlich und nahmen von AMP mit 18 kJ/mol über ADP mit 20 kJ/mol bis ATP mit 22 kJ/mol zu. Bei **18** erhöhten sich diese Werte entsprechend auf 22, 24, 27 kJ/mol und für **19** auf 24, 26, 28 kJ/mol. Es konnte gezeigt werden, dass die Energiebeträge hauptsächlich aus elektrostatischen Wechselwirkungen bestehen, da Vergleichsmessungen von **16** mit Adenosin ohne die Phosphatreste zu  $\Delta G$  von nur 5.6 kJ/mol führen. Selektivitäten für verschiedene Nucleobasen nahmen mit der Ringgröße des Calixarenes zu, z. B. liegt  $\Delta G$  für AMP und TMP mit **16** bei 1 kJ/mol, für **18** bei 2 kJ/mol und für **19** bei 3 kJ/mol.

Diese geringen Unterschiede korrelieren gut mit theoretischen Berechnungen, welche zeigen konnten, dass die aromatische Base bzw. der Zucker nur teilweise in die Kavität eintauchen und damit nur einen geringen Beitrag leisten (siehe Abb. 2-20).

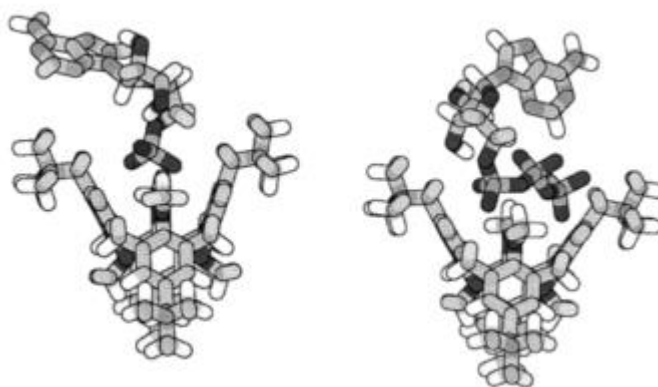


Abb. 2-20 QUANTA/CHAMM minimisierte Strukturen des Komplexes **16**-ADP und **16**-ATP. (Copyright 2013 Royal Society of Chemistry. Verwendet mit Genehmigung.<sup>60</sup>)

Die Funktionalisierung eines Calix[n]arenes ( $n = 4, 6, 8$ ) mit bis zu acht Permethylammoniumionen erlaubte die erfolgreiche Bindung von Nucleotiden in Wasser mit Bindungskonstanten bis zu  $7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

Diese neuen Aminocalixarene **16** - **19** sollten nun auf ihr Potential, DNA zu binden, mit Polyaminen verglichen werden. Polyamine zeigen normalerweise mit der Anzahl der positiven Ladungen eine lineare Abhängigkeit der Bindungsaffinität gegenüber doppelsträngiger DNA (Prinzip der additiven Inkremente). Dies konnte über die Anzahl der Salzbrücken zwischen den Stickstoffzentren und den Phosphatgruppen auf  $5 \pm 1 \text{ kJ/mol}$  quantifiziert werden.<sup>61</sup> Die Affinitäten der Aminocalixarene gegenüber Kalbsthymus-DNA (ctDNA) wurden über eine thermische Denaturierung und fluoreszenzspektroskopisch anhand eines Ethidiumbromid-Verdrängungsassays bestimmt. Hier zeigte **16** durch seine vier positiven unidirektionalen Ladungen den stärksten Effekt. In Abb. 2-21 sind die Ergebnisse der thermischen Denaturierung durch die Änderungen der UV-Absorption bei 260 nm in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Die Temperatur für eine Denaturierung des ctDNA-Doppelstranges in seine Einzelstränge wird durch eine deutliche Zunahme in der Absorption charakterisiert. Hier wurde neben einer Bestimmung reiner ctDNA (Kurve a) auch eine Vergleichsmessung eines Komplexes mit Spermin (Kurve b), einem starken DNA-Liganden, und **16** durchgeführt (Kurve c). Man sieht, dass Spermin eine Erhöhung und damit eine Stabilisierung der Denaturierungstemperatur von  $+14^\circ\text{C}$  bewirkt, **16** dagegen mit  $+20^\circ\text{C}$  zu einer noch deutlicheren Stabilisierung führt.

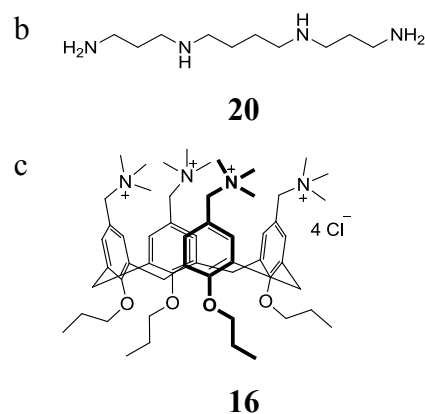
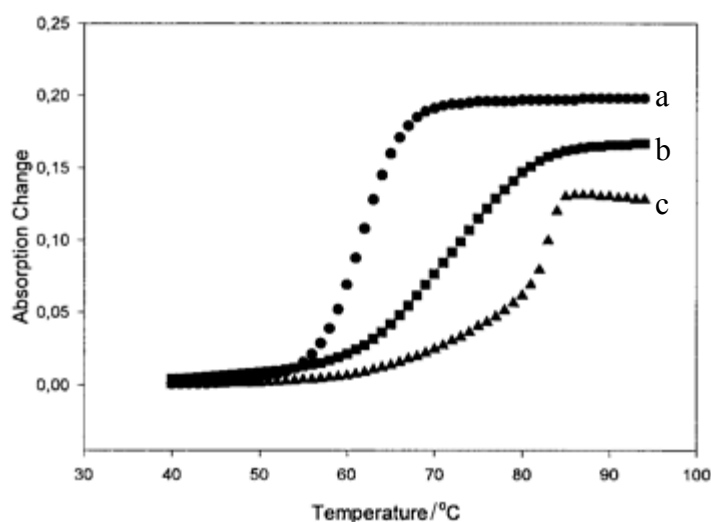


Abb. 2-21 Änderung der Absorption während einer thermischen Denaturierung in SHE Puffer mit a) ctDNA, b) Komplex mit Spermin, c) 0.1 Äquivalente **16** pro Nucleobase. (Copyright 2013 Royal Society of Chemistry. Verwendet mit Genehmigung.<sup>60</sup>)

Die Bestimmung der Denaturierungstemperatur und die Auswertung des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays für **16** zeigte eine stärkere Bindung mit DNA als für das gleichwertig geladene aliphatische Spermin **20** gefunden wurde. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass auch die Phenylreste des Calixarenes an einer Wechselwirkung beteiligt sein könnten. Die größeren Calixarene zeigen trotz der 6 oder 8 Ladungen nur eine geringfügige Verbesserung. Hier bestätigten Berechnungen, dass die Ammoniumgruppen zu weit auseinander liegen und deshalb nicht alle gleichzeitig mit der Bindungsstelle wechselwirken können. Zudem zeigten die Liganden **16**, **17** und **18** eine Präferenz für DNA im Vergleich zu RNA. *Molecular modeling* mit *CHARMm* unter Verwendung einer idealen B-DNA Konformation erbrachte, dass eine Wechselwirkung zwischen **16** und DNA bis zu acht Salzbrücken ausbilden kann und zeigten auch einen Kontakt zwischen den Phenylgruppen und der DNA-Furche. NMR-Messungen erbrachten dagegen, dass die Phenylgruppen nicht mit der DNA interkalieren.<sup>60</sup> *Schneider et al.* konnten insgesamt zeigen, dass eine Interaktion mit DNA vorwiegend durch elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt wird und dadurch eine Stabilisierung der Helix erfolgt.



## 2.5 GENTRANSFEKTION

Als Gene werden einzelne Abschnitte der DNA bezeichnet, welche Informationen zur Biosynthese von Proteinen codieren. Mutationen in diesem Bereich können sowohl zum Funktionsverlust als auch zu einer Aktivitätssteigerung von Proteinen führen. Hier kommt die Gentherapie zum Einsatz, welche sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer Methode entwickelte, mit der z. B. genetische Fehlfunktionen wie SCID (schwerer kombinierter Immundefekt), Mukoviszidose und Parkinson behandelt werden.<sup>62</sup> Im Vergleich zur klassischen Medizin, bei welcher ein Wirkstoff von außen in den Körper gebracht wird, bietet die Gentherapie die Möglichkeit, genetische Information im Inneren des Körpers so zu verändern, dass eine gestörte Biosynthese korrigiert werden kann. In allen gentherapeutischen Ansätzen erfolgt ein Transfer von Nucleinsäuren durch Transportsysteme, den sogenannten Vektoren, in die Zellen. Angestrebte Eigenschaften sind dabei eine Langzeitwirkung, eine systemische oder lokale Regulierbarkeit der Genexpression, eine relativ milde Einflussnahme auf physiologische Prozesse und möglichst geringe Nebenwirkungen.<sup>8</sup> Allerdings befindet sich diese neue Therapieform, was ihren Einsatz am Patienten angeht, noch in der Entwicklungsphase. Trotz erster Erfolge sind noch Rückschläge und Nebenwirkungen zu verzeichnen.<sup>9</sup> Die Forschung konzentriert sich momentan auf die Entwicklung von effektiven Transportsystemen, welche die Oligonucleotide verdichten und während des Transports zum Zielort schützen. Prinzipiell können Vektoren unterteilt werden in physikalische, virale und nicht-virale Vektoren. Unter den physikalischen Vektoren versteht man eine direkte Übertragung der DNA durch die Zellmembran in die Zelle, wofür verschiedene Techniken zur Verfügung stehen, z. B. die Injektion. Zusätzlich erleichtern Elektrophorese oder Ultraschall durch elektrische oder Schallimpulse die Durchlässigkeit der Zellmembran. Die Vorteile der physikalischen Vektoren sind, dass sie nicht zytotoxisch sind und eine mehrmalige Gabe möglich ist. Zudem gibt es keine Einschränkungen in Bezug auf die Länge der DNA. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass keine Zellspezifität gegeben ist und die Zellmembran mechanisch durchdrängt werden muss.<sup>63</sup>

Virale Vektoren basieren auf natürlichen Viren, welche evolutionsbedingt das Einschleusen ihres Erbmateri als in einen ausgesuchten Wirt perfektioniert haben. Zur Anwendung in der Gentherapie werden diese Viren so modifiziert, dass sie zwar ihre Eigenschaften der Zellerkennung und des Gentransports beibehalten, jedoch ihre Replikationsfähigkeiten und ihre pathogenen Eigenschaften entschärft werden. Zusätzlich enthalten sie das Gen, welches eingeführt werden soll. Zu diesen „entschärften“ Viren zählen z. B. die Retro- und Lentiviren, Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren.<sup>10</sup> Der Vorteil der viralen Vektoren liegt in ihrer

extrem hohen Transfektionseffizienz, ihrer Selektivität bezüglich des Zelltyps und ihrer breiten Anwendbarkeit. Ihr Nachteil ist jedoch, dass sie immer noch ein gewisses pathogenes Risiko mit sich bringen und zu einer unerwünschten Immunantwort führen können. Auch kann es bei einem Gentransfer zu einer sogenannten Insertionsmutagenese kommen, bei welcher es zur Zerstörung oder Dysregulation eines zellulären Gens kommt. Wird dabei ein Tumorsuppressorgen inaktiviert oder ein Protoonkogen aktiviert, kann sich aus der Zelle eine Tumorzelle entwickeln. Außerdem ist eine Produktion der viralen Vektoren in größeren Mengen nicht trivial und auch die mangelnde Akzeptanz der Öffentlichkeit spielt eine Rolle.<sup>11</sup> Eine Alternative zu den viralen Vektoren stellen die nicht-viralen Vektoren dar. 1987 erschien der erste Bericht über eine DNA-Transfektion durch ein kationisches Lipid, welches mit DNA zu den sogenannten Lipoplexen aggregieren.<sup>64</sup> Es handelt sich dabei um DOTMA **22**, welches kleine unilamellare Liposomen ausbildet. Ein weiteres Beispiel dieser Klasse ist DOPE **21**, welches häufig als Helferlipid zusätzlich zu anderen synthetischen Vektoren eingesetzt wird. Der Einsatz von natürlich vorkommenden Helferlipiden, auch Colipide genannt, ist eine weitere vielversprechende Vorgehensweise und soll die Balance zwischen Effizienz und Toxizität ermöglichen.<sup>65,66</sup>

Zu den synthetischen Vektoren gehören weiterhin kationische Polymere, wie Poly(L-Lysin) **23**, Polyethylenimin (PEI) **24** und Polyamindendrimere (z. B. PAMAM), welche mit DNA sogenannte Polyplexe ausbilden.

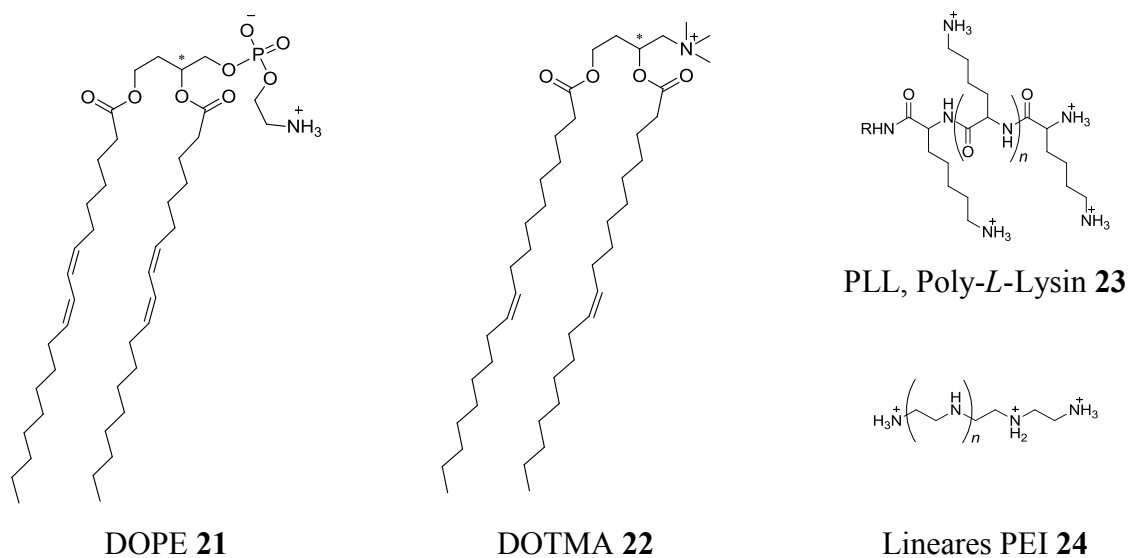


Abb. 2-22 Eine Auswahl an nicht-viralen Vektoren, wobei es sich bei **21** und **22** um kationische Lipophile und bei **23** und **24** um kationische Polymere handelt.

All diese Vektoren kondensieren DNA und führen zur Ausbildung von positiv geladenen Lipoplexen bzw. Polyplexen. Dabei stoßen die nicht-viralen Vektoren im Vergleich zu den viralen auf viele extra- und intrazelluläre Hindernisse, die es zu überwinden gilt. Während die

viralen Vektoren über selektive Rezeptoren mit der Zellwand interagieren, binden die meist positiv geladenen Lipoplexen bzw. Polyplexen über elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladene Zelloberfläche und werden über adsorptive Endozytose internalisiert.<sup>67</sup> Beim Vorgang der Endozytose, welcher in Abb. 2-23 dargestellt ist, stülpt sich die Zellmembran ein und es wird durch Abschnürung ein Vesikel innerhalb der Zelle, das so genannte Endosom, gebildet.

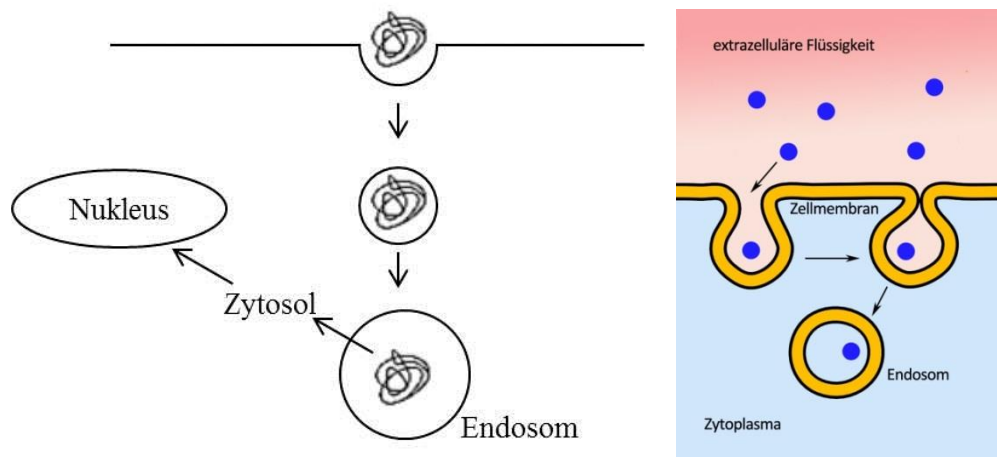


Abb. 2-23 Schematische Darstellung des Pfades einer Plasmid DNA während einer Transfektion in den Nucleus (links). Vereinfachte Darstellung des Mechanismus der Endocytose (rechts).

Da die meisten Zellen eine negativ geladene Zelloberfläche besitzen, fehlt den nicht-viralen Vektoren jegliche Zelltypspezifität. Insbesondere die unbeschadete Freisetzung der Partikel aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zelle (auch Endosomolyse genannt) stellt für viele nicht-virale Vektoren noch ein großes Problem dar.<sup>62</sup> Polyplexe nutzen einen zelleigenen Mechanismus, den Transport der Endosomen entlang des Cytoskeletts der Zelle. Bei diesem Transport in Richtung Zellkern wandeln sich die Endosomen in Lysosomen um und dabei sinkt ihr pH-Wert von 7.2 auf etwa 5.5 bis 5.0 ab. Ein Teil der Nucleinsäure wird zwar in den Lysosomen abgebaut, aber einige Polymere können diesen pH-Gradienten nutzen, um ihre Fracht, die transportierte DNA, ins Zytoplasma der Zelle freizusetzen. PEI-Polyplexe z. B. zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus den Lysosomen sehr gut freigesetzt werden. Dies erfolgt unter anderem nach dem „Protonen-Schwamm-Mechanismus“. Im Endosom herrscht ein pH-Wert von etwa 7.2, wobei hier nur ein Drittel der Stickstoffatome des PEI protoniert ist. Fällt der pH im Lysosom auf etwa 5.5 ab, kann das PEI durch Protonierung der übrigen Stickstoffatome die einströmenden Protonen abpuffern. Ein nachfolgender Einstrom von Chlorid-Anionen und Wasser führt letztendlich zum Platzen der Lysosomen und die Polyplexe werden ins Zytoplasma freigesetzt. Die Nucleinsäure kann von dort, entweder in freier Form oder weiterhin an den Vektor gebunden, in den Zellkern gelangen. Die Pufferkapazität

des Polymers hat noch einen weiteren Effekt: Das pH-Optimum der lysosomalen Nukleasen wird nicht erreicht und die eingeschlossene Nukleinsäure bleibt überwiegend intakt.<sup>68,69</sup>

All diese Systeme sind Oligomere oder gar Polymere, welche aus mehreren positiven Ladungen bestehen. Ihre Effektivität steigt im Allgemeinen mit zunehmendem Molekulargewicht und mit der Anzahl der Ladungen. Es gibt aber auch schon einige Ansätze für eine effiziente Transfektion mit sehr viel kleineren Molekülen. Hier ist ein neuartiger dreiarmer Gentransporter auf Peptid-basis zu nennen, welcher im *AK Schmuck* von *Kuchelmeister* entwickelt wurde und sogar mit kationischen Polymeren konkurrieren kann. Das Molekül **25** besteht aus den Aminosäuren Lysin und Phenylalanin und einer Anion-Bindungsstelle am *N*-Terminus, welche eine hohe Affinität zu DNA ausweist ( $K = 2.6 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ ) und mit nur 3 - 4 positiven Ladungen bei physiologischem pH das Plasmid des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) effektiv in Zellen transfiziert. Vergleicht man diesen kleinen organischen Vektor mit dem kationischen Polymer PEI zeigt **25** eine höhere Effizienz und weist zudem eine geringere Zytotoxizität auf.<sup>70</sup>

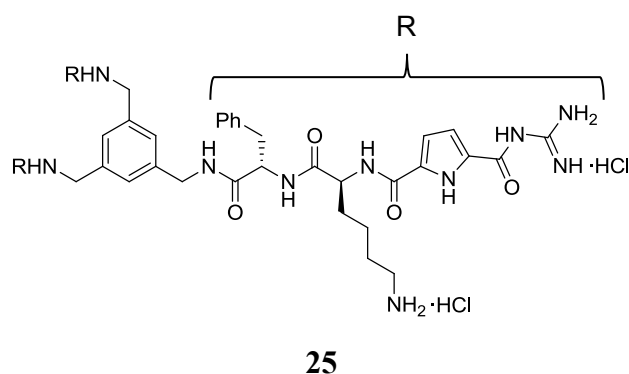


Abb. 2-24 Ein synthetischer organischer Vektor zeigt eine höhere Effizienz und weist zudem eine geringere Cytotoxizität als PEI auf.<sup>70</sup>

Hier spielt die Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheit eine entscheidende Rolle, da sie durch die Acetylierung der Guanidiniumgruppe einen  $pK_s$ -Wert von 6 - 7 aufweist. Durch die pH-Erniedrigung im Zytoplasma wird die Guanidino-Gruppe protoniert und kann als Protonenschwamm im Endosom fungieren, d. h. durch eine steigende Protonen- und damit Chlorid- und Wasser-Aufnahme zu dessen Bruch führen (siehe Abb. 2-25).

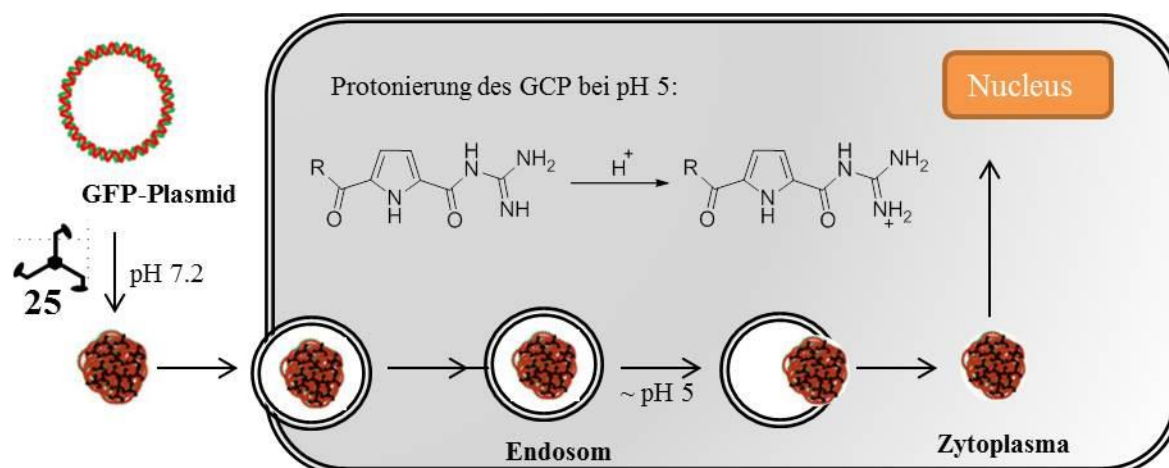


Abb. 2-25 Aggregation des Rezeptors 25 mit markierter Plasmid DNA bewirkt die Aufnahme in das Zytoplasma durch Endozytose.<sup>70,71</sup>

Trotz der vergleichsweise geringen Größe ermöglichen die Eigenschaften des peptidischen Vektors, nämlich seine Fähigkeit zur Aggregatbildung mit DNA und der  $pK_s$ -Wert von 6.5, eine effiziente Transfektion.

Auch Guanidiniumgruppen ohne eine Acetylierung stellen ein erfolgsversprechendes Motiv beim Design von Rezeptoren für anionische Substrate dar. Das Guanidinium-Ion hat einen  $pK_s$  von 13.5, weshalb es über einen großen pH-Bereich protoniert vorliegt und somit als Wasserstoffbrücken-Donor fungieren kann. In einigen Fällen zeigten die Guanidinium-basierten Liganden Zellpenetration und effiziente Gentransfektion.<sup>72</sup> Dazu war der Einsatz eines Helferlipides, DOPE notwendig (21, S.216). Durch diese Kombination aus kationischem Lipid, auch Cytofectin genannt, und neutralem, biologisch zugänglichem Helferlipid (Colipid) wird eine Balance zwischen hoher Effizienz und geringster Toxizität ermöglicht.

Ungaro *et al.* untersuchten die DNA-Kondensations- und Zelltransfektionseigenschaften von Guanidiniumcalixarenen (26 - 32), wobei Systeme verschiedener Lipophilie, Größe und Konformation verglichen wurden.<sup>73</sup> Zur Bestimmung der Wechselwirkung mit DNA wurden EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Essay*), DNA-Denaturierungsmessungen, Ethidiumbromid-Verdrängungsassays und AFM durchgeführt. Anhand der gewonnen Daten konnten drei unterschiedliche Bindungsmodi für die verschiedenen Strukturen unterschieden werden (siehe Abb. 2-26).

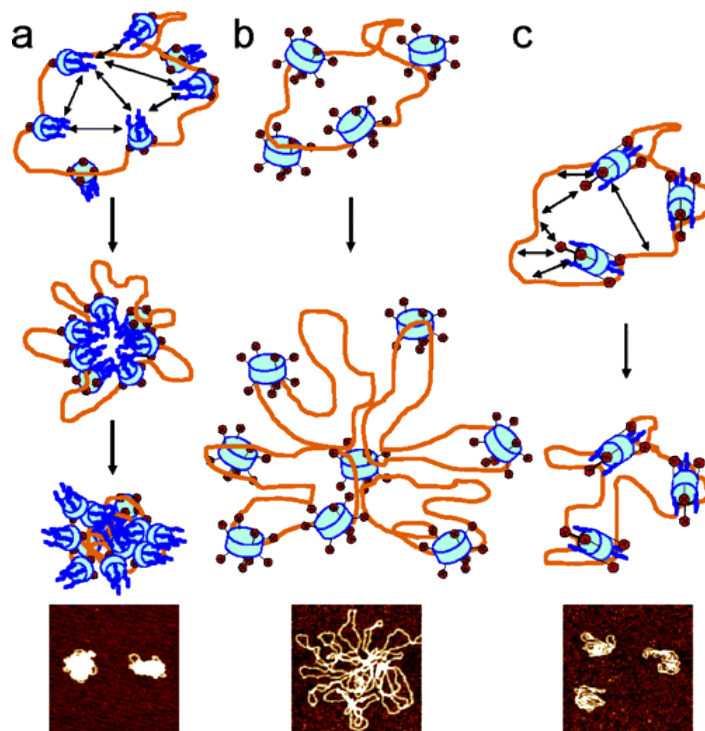
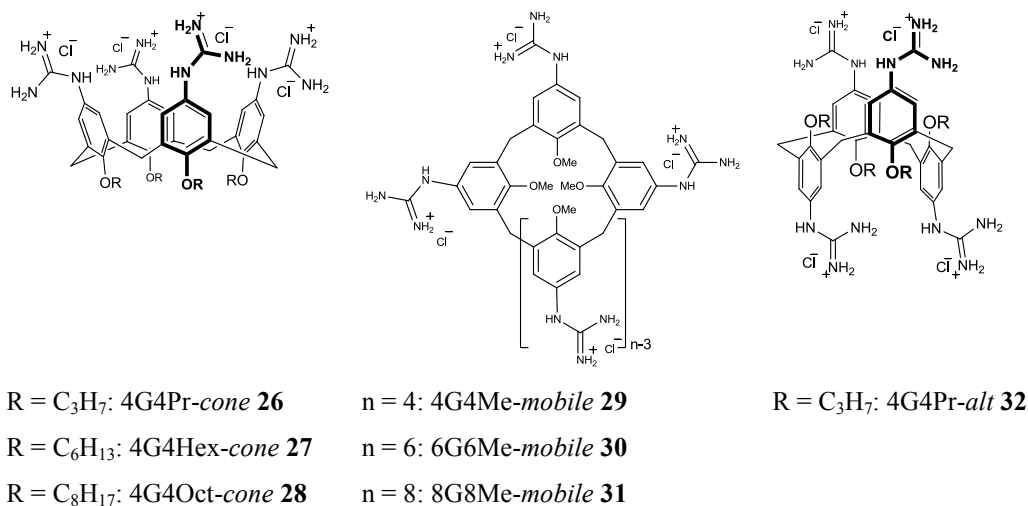


Abb. 2-26 Guanidiniumcalixarene führen in Abhängigkeit von Lipophili, Größe und Konformation zu den drei unterschiedlichen Bindungsmodi a, b und c. (Copyright 2013 American Chemical Society. Verwendet mit Genehmigung.)<sup>73</sup>

Bei den Calix[4]arenen **26** - **28** mit *cone*-Konformation findet eine konzentrationsabhängige Kondensation der Plasmid-DNA statt. Das lässt sich entsprechend Abb. 2-26a dadurch erklären, dass hier die positiv geladenen Guanidiniumgruppen von derselben Seite des Rings mit dem negativ geladenen DNA-Rückgrat wechselwirken. Dies führt zu einer Zunahme der lokalen Konzentration der Calix[4]arene und begünstigt damit eine hydrophobe Wechselwirkung der lipophilen Ketten. Damit werden verschiedenen Bereiche der Plasmid-DNA zusammengebracht und dadurch die Bildung intramolekularer Kondensate ermöglicht. Dieser intramolekulare Kondensationsmodus zeigt die besten Erfolge bei der Zelltransfektion. Dabei sind jedoch lediglich die deutlich lipophilen Calixarene mit Hexyl- oder Octylresten

(**26**, **27**) in der Lage, die Zelltransfektion bei 15-20  $\mu\text{M}$  zu bewirken. NMR-Studien haben gezeigt, dass **27** in  $\text{D}_2\text{O}$  auch zur Selbstaggregation neigt, jedoch erst ab einer Konzentrationen größer 0.2 mM. Die DNA-Kondensation findet dagegen bereits bei einer micromolaren Calixarenkonzentration statt und zeigt damit, dass die Aggregation der DNA-gebundenen Makrocyclen durch eine höhere lokale Konzentration effizienter ist.

Die konformativ mobilen Calix[6]- **30** und Calix[8]arene **31** mit Methoxygruppen an ihrem *lower rim* sind größer und dadurch auch in der Ausrichtung der Guanidiniumgruppen flexibler. Sie sind gut wasserlöslich und aggregieren nicht in einem Konzentrationsbereich von  $4 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-2}$  M. Die Guanidiniumgruppen sind in Bezug zur Calixarenebene entgegengesetzt angeordnet (z. B. drei oder vier nach oben und drei oder vier nach unten) und können deshalb gleichzeitig mit mehreren DNA-Strängen in Wechselwirkung treten, was die Bildung intermolekularer Aggregate ermöglicht (siehe Abb. 2-26b). Jedoch konnte in diesem Fall auch unter Einsatz von DOPE keine Zelltransfektion erreicht werden.

Den dritten Bindungsmodus stellen die Calix[4]arene **29** und **32** dar, welche jeweils in Lösung eine *1,3-alternate*-Konformation ausbilden. Diese zeigen ein Verhalten zwischen den beiden anderen, weil sie die DNA zwar kondensieren, jedoch dieser Prozess auf Ladungswechselwirkungen basiert (siehe Abb. 2-26c). Eine Transfektion konnte hier nicht beobachtet werden, was mit der geringen Lipophilie durch die *1-3-alternate*-Konformation erklärt werden kann. Auch unter Zugabe von DOPE zeigen **29** und **32** eine geringe Transfektionseffizienz und zudem eine hohe Cytotoxizität, v. a. bei den erforderlichen Konzentrationen von 10 – 20  $\mu\text{M}$ .

Eine deutliche Erhöhung der Effizienz konnte durch weitere Studien erreicht werden, indem die Guanidiniumgruppen am *lower rim* des Calixarenes über einen Propyllinker eingeführt wurden und **33** mit DOPE in verschiedenen Zusammensetzungen zur Transfektion eingesetzt wurde.<sup>66</sup> Die besten Ergebnisse erbrachte ein Verhältnis von Ligand / DOPE = 1 / 2 bei einer Ligandenkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  und damit einem Verhältnis von Guanidinium zu Phosphat von vier. Auch hier spielt der Substituent am gegenüberliegenden *upper rim* eine entscheidende Rolle was die DNA-Kondensationseigenschaften, die Transfektionsfähigkeit und die Toxizität anbelangt. Wie in Abb. 2-27 dargestellt, zeigte sich, dass **33** die Transfektion mit der höchsten Effizienz für RD-4 Human Rhabdomyosarcom Zellen bewirkt. Die Menge an transferierten Zellen ist mit 48 % größer als die, welche durch das bekannte Transfektionsreagenz, Lipofektamin LTX mit 30 % erreicht wurde. Die früheren *upper rim* Tetraguanidiniumcalix[4]arene **27** und **28** lagen mit 20 % darunter. Hier wurden auch erste Hinweise auf die Bedeutung des Makrocycluses gefunden, indem **33** als lineares offenes

Analogon zum Vergleich synthetisiert wurde und mit 6 % Transfektionseffizienz bei 20  $\mu$ M deutlich schlechter abschnitt.

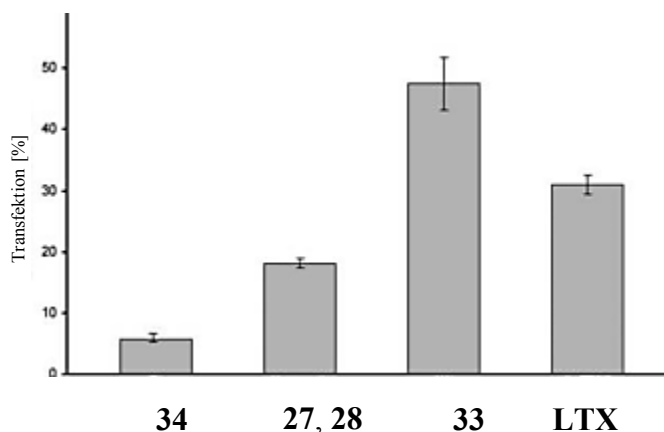


Abb. 2-27 Transfektionseffizienz in Prozent der transfizierten Zellen erhalten durch eine Behandlungen mit RD-4 Human Rhabdomyosarcom Zellen mit Guanidiniumderivaten / DOPE (2:1) Formulierungen im Vergleich zu LTX.<sup>66</sup>

Ein Vergleich der DNA-Kondensation und Zelltransfektionseffizienz des aktivsten Calixarenes **33** mit seinem offenkettigen Analogon **34**, welche sich in ihrem Lipophilie / Hydrophilie Verhältnis ähneln, erlaubt einen ersten Rückschluss auf die Bedeutung des makrocyclischen Grundgerüsts für die Gentransfektion.<sup>66</sup>

Die Untersuchung verschiedenster potentieller Strukturen auf ihre Eignung als Vektor für eine Gentransfektion soll zu einer detaillierten Aufklärung der zellulären Aufnahme und der anschließenden intrazellulären Fortbewegung führen. Dabei sind noch viele Fragen, was die Beziehung zwischen der Struktur eines Vektors und seiner Aktivität angeht, offen.



## 2.6 DIE ATPASE P97

Durch eine Kooperation mit *Prof. Hemmo Meyer* vom ZMB der Universität Duisburg-Essen wurde in dieser Arbeit auch die Untersuchung des Proteins P97 ermöglicht. P97 ist ein hexamerer Protein der  $AAA^+$  (*ATPases associated with diverse cellular activities*) Familie, welche häufig im Zytoplasma und im Nucleoplasma vorkommt und in Eukaryoten konserviert ist. Als ATP-getriebene molekulare Maschine ist P97 für die Transformation chemischer Energie in biologische Prozesse verantwortlich. Dazu gehört der Transport von Proteinen während der ER-assoziierten Degradierung (ERAD) vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Zytosol. Dies ist von großer Bedeutung, da eine Degradierung im zytosolischen Ubiquitin-Proteasom System (UPS), dem wichtigsten Proteinabbaumechanismus in eukaryotischen Zellen, stattfindet. Nur Proteine, die zuvor in einem mehrstufigen Prozess mit einer Kette aus Ubiquitin-Molekülen markiert wurden, werden vom Proteasom erkannt. P97 bindet als Teil des UPS über Adapter-Proteine an ubiquitinierte Substrate. Es entfaltet diese ganz oder teilweise oder extrahiert sie von Bindungspartnern unter ATP-Hydrolyse zur weiteren Prozessierung.

P97 besteht aus sechs identischen  $\sim 90$  kDa Protomeren, welche zu einem Hexamer mit zentralem Kanal assemblieren. Jedes Protomer besteht aus drei Domänen, die über kurze Linker zusammengehalten werden. Charakteristisch für diese Familie von Proteinen sind die AAA-Domänen D1 und D2, welche je ein *Walker A* (*P-loop*) und *Walker B* (*DEXX box*) Motiv zur Bindung von ATP und zur Hydrolyse enthalten. Die *N*-terminale Domäne ist notwendig für die Interaktion mit Adapter-Proteinen und ER-Membran-Rezeptoren.

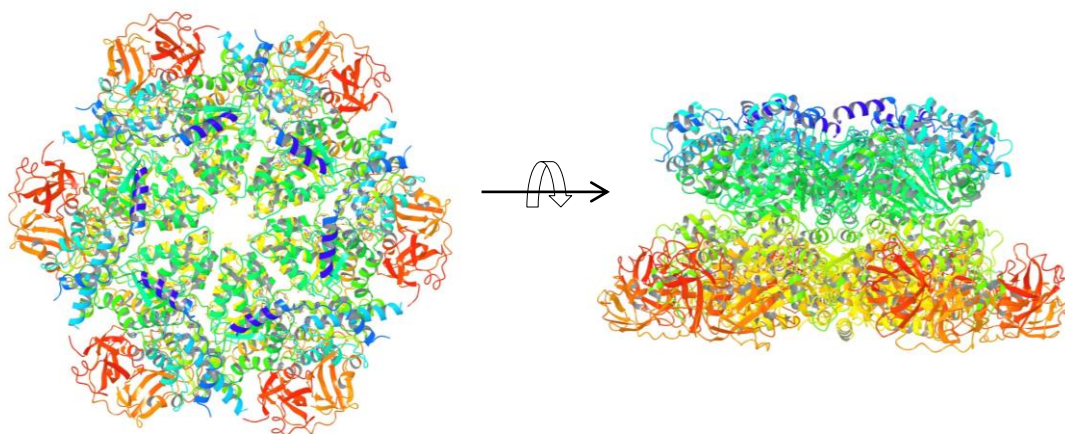


Abb. 2-28 Struktur des Hexamers P97 (PDB: 3cf3) als ribbon-Darstellung zeigt die einzelnen Domänen: D1 = gelb, D2 = grün, N = rot.

Der Mechanismus der ATP-Hydrolyse in  $AAA^+$  Proteinen besteht aus einem nucleophilen Angriff eines aktivierten Wassermoleküls am  $\gamma$ -Phosphor eines ATP wobei ein

pentakoordinierten Übergangszustand entsteht. Die negative Ladung am  $\gamma$ -Phosphor wird stabilisiert durch  $\text{Mg}^{2+}$  und durch umgebende positiv geladene Gruppen und Wasserstoffbrücken. Deshalb enthält eine ATPase eine katalytische Base, welche ein Wassermolekül aktivieren kann, und elektrophile Gruppen, welche den negativ geladenen Übergangszustand stabilisieren. Weitere Gruppen koordinieren das als Cofaktor essentielle Magnesium-Ion.

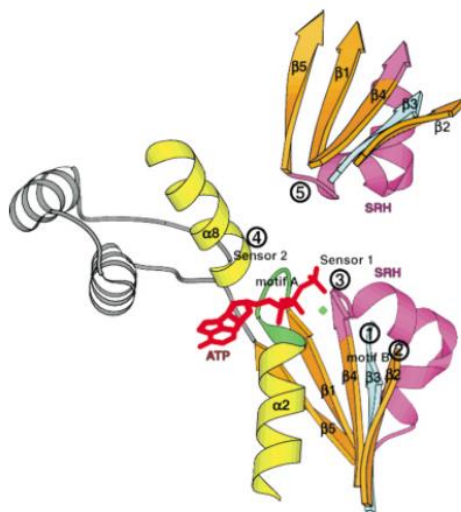


Abb. 2-29 Beispielhafter Aufbau einer ATP-Bindungsstelle in  $\text{AAA}^+$  ATPasen. Das Nucleotide ist rot und das Magnesium-Ion und grün gefärbt. ((Copyright 2013 John Wiley and Sons. Verwendet mit Genehmigung.<sup>74</sup>)

Ein genereller Aufbau einer ATP-Bindungstasche für ATPasen ist in Abb. 2-29 dargestellt. Die Nucleotid-Bindungstasche besteht aus einem fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Die hochkonservierten Reste des *Walker A Motifs* (Gly-xxxx-Gly-Lys-Thr; xxxx steht für beliebige Aminosäuren) bilden den sogenannten *P-loop* aus. In P97 bildet Lys 251 ionische Wechselwirkungen mit den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatsauerstoffen des Nucleotides aus und das konservierte Thr 252 koordiniert das Magnesium-Ion. Das Nucleotid sitzt in einer Tasche am C-Terminus des  $\beta$ -Faltblatts und seine Adenin-Base wird durch Reste der C- und N-Domäne eingeschlossen.

Das *Walker B Motiv* beinhaltet die Sequenz Asp-Glu-xx mit den beiden Carboxylatseitengruppen in Position 1, Abb. 2-29, welche in das aktive Zentrum zeigen. Die erste, Asp<sup>304</sup> ist bei der  $\text{Mg}^{2+}$ -Koordination beteiligt und das Carboxylat der Glu<sup>305</sup> dient wahrscheinlich als katalytische Base. Es ist noch nicht vollständig verstanden, auf welche Weise eine ATP-Bindung und die Hydrolyse eine Konformationsänderung in  $\text{AAA}^+$  Proteinen auslösen. Hier mangelt es noch an hochaufgelösten Aufnahmen des Proteins in den verschiedenen Stadien des Reaktionszykluses.<sup>74</sup> Eine weitere Möglichkeit zur Aufklärung dieser Prozesse ist es, eine von außen bewirkte Veränderung der Funktion auszulösen.

*Brunger et al.* untersuchten die Funktionsweise von P97 indem er verschiedenste Mutanten herstellte und nach geeigneten Substraten suchte. Die Ergebnisse führten zu einem detaillierteren Modell für die Proteindislokation aus dem ER ins Zytosol. Dabei dringt das jeweilige Substrat durch die D2-Domäne in die zentrale Pore ein und tritt gar nicht durch die D1-Domäne. D1 ist dabei verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Stabilität des Hexamers. Eine genaue Beziehung zwischen Hexamer, Adapter-Proteinen und Substrat ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch die Konformation eines transportierten Substrates ist nicht im Detail verstanden. Innerhalb dieser Studien zeigte Synaptotagmin (Sytl) als erstes Protein eine Beschleunigung der ATPase-Aktivität.<sup>75</sup>

*Meyer et al.* konnten dagegen zeigen, dass P47 die ATPase-Aktivität von P97 um bis zu 85 % hemmt.<sup>76</sup> P47 ist ein Cofaktor des P97 und spielt eine entscheidende Rolle bei der zytoplasmatischen Membranfusion. Dabei wird eine Fusion von einem Vesikel mit einer Targetmembran über SNAREs (*soluble N-ethylmaleimid-sensitiv factor attachment protein receptor*) reguliert, wobei man zwischen v-SNAREs (auf dem Vesikel) und t-SNAREs (auf der Targetmembran) unterscheidet. Diese wechselwirken miteinander und bilden ein Dimer aus, welches beide Membranen miteinander verknüpft und so eine Fusion katalysiert. Nach diesem Prozess befinden sich beide in derselben Membran und müssen mithilfe anderer Proteine getrennt und damit für eine weitere Fusion freigegeben werden. Für die Golgi-Membran ist P97 dafür zuständig, wobei erst durch den Cofaktor P47 eine Bindung zwischen P97 und Golgi t-SNARE vermittelt wird.

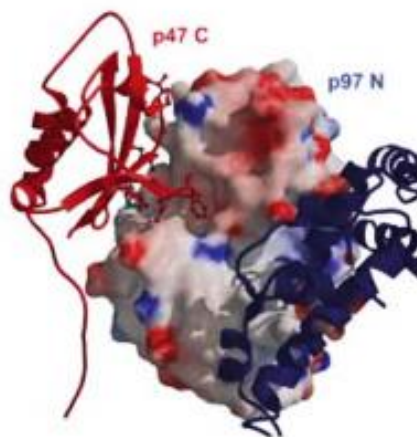


Abb. 2-30 Bindung von P47 C mit der P97 N-Domäne. Dargestellt ist die elektrostatische Oberfläche der N-Domäne des P97, welche mit P47 C wechselwirkt: rote ribbon-Darstellung und ball-and-stick-Darstellung der entscheidenden Aminosäurerest des P47 C, blaue ribbon-Darstellung der D1-Domäne. (Copyright 2013 Elsevier. Verwendet mit Genehmigung.<sup>77</sup>)

Es wurden ATPase Aktivitätsassays durchgeführt, welche zeigten, dass die Inhibierung sowohl konzentrationsabhängig als auch sättigungsfähig ist. Ein Maximum von 85 % wurde mit einem Verhältnis von P47 zu P97 = 1:1 erreicht. Eine weitere Bestimmung unter Erhöhung des ATP-Anteils zeigte, dass keine kompetitive Inhibierung vorliegt. Diese Messungen wurde bei pH = 9 durchgeführt, da P97 hier am aktivsten ist.

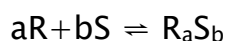
Die exakte Funktion der Inhibierung von P47 ist noch nicht aufgeklärt. Eine Idee ist, dass P47 die Aktivität der ATPase hemmen soll, bis sie für die Membranfusion benötigt wird.

AAA<sup>+</sup> - ATPasen sind wichtige molekulare Maschinen und an vielen biochemischen Prozessen beteiligt. Als solche weist auch P97 eine physiologisch-medizinische Relevanz auf, weshalb eine detaillierte Aufklärung seines Wirkmechanismus für therapeutische Ansätze von großer Bedeutung ist.

## 2.7 METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER ASSOZIATIONSKONSTANTEN VON REZEPTOR-SUBSTRAT-KOMPLEXEN

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Methoden zur Charakterisierung der thermodynamischen Prozesse und der Quantifizierung der Bindungskonstanten von Rezeptor-Substrat-Komplexen vorgestellt. Der Anspruch hierbei ist, eine Methode und die notwendigen Bedingungen zu finden, welche die Bindungskonstante mit hoher Verlässlichkeit liefert. Hierzu kamen die UV/Vis-Spektroskopie und die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) zum Einsatz aber auch mikroskopische Methoden zur Untersuchung der Oberflächenstruktur mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, „atomic force microscopy“) und die Bestimmung des hydrodynamischen Radius in Lösung mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS, „dynamic light scattering“) sollten zu einem Gesamtbild beitragen. Zur Untersuchung einer Wechselwirkung mit biologischen Makromolekülen wurden spezielle fluorometrische Assays wie ein Ethidiumbromid-Assay und ein ATPase-Assay angewandt.

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten, bzw. Assoziationskonstanten  $K_{Ass}$ , gilt dabei für einen Komplex  $R_aS_b$  das Massenwirkungsgesetz (Gl. 2-2).



$$K_{Ass} = \frac{[R_aS_b]}{[R]^a \cdot [S]^b} \quad \text{Gl. 2-2}$$

Die Gesamtkonzentrationen des Rezeptors  $[R]_0$  und des Substrates  $[S]_0$  können durch die Summe aus den Konzentrationen beider Komponenten im Gleichgewicht und der

Konzentration des entstehenden Komplexes ausgedrückt werden. Es gilt:  $[R]_0 = [R] + a \cdot [R_a S_b]$  und  $[S]_0 = [S] + b \cdot [R_a S_b]$ , welche in das Massenwirkungsgesetz eingesetzt werden, um Gl. 2-3 zu erhalten.

$$K_{Ass} = \frac{[R_a S_b]}{([R]_0 - a \cdot [R_a S_b])^a \cdot ([S]_0 - b \cdot [R_a S_b])^b} \quad \text{Gl. 2-3}$$

Diese Gleichung erlaubt die Bestimmung der Bindungskonstanten, da sie die Beziehung zwischen der Konzentration des Komplexes, der Bindungskonstante und den Gesamtkonzentrationen herstellt. Nachdem über ein zusätzliches Experiment die stöchiometrischen Faktoren bestimmt werden können, bleibt nur noch eine unbekannte zu ermittelnde Größe, die Komplexkonzentration  $[R_a S_b]$ .

In Abhängigkeit von der Größe der Bindungskonstanten gibt es nun eine Anzahl verschiedener Methoden mit denen eine Bindungskonstante bestimmt werden kann (siehe Tab. 2-3).

Methode	Bindungskonstante / $M^{-1}$
$^{13}C$ -NMR	$< 10^2$
$^1H$ -NMR	$< 10^4$
UV/Vis	$< 10^5$
Fluoreszenz	$< 10^8$
ITC	$10^2 - 10^8$

Tab. 2-3 Unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Bindungskonstanten in Abhängigkeit von ihrer Größenordnung.

Der Unterschied liegt nun darin, auf welche Weise die Komplexkonzentration bestimmt wird. Bei der Bildung eines Rezeptor-Substrat-Komplexes ändern sich die jeweils detektierten Eigenschaften wie die Absorption, Signalverschiebung oder es findet eine Wärmeänderung statt. Bei der im Folgenden diskutierten UV/Vis-Spektroskopie geschieht dies über die veränderte Absorption, welche proportional zu der Konzentration des entstehenden Komplexes ist.<sup>78,79</sup>

### 2.7.1 UV/Vis-Titration

Gleichung Gl. 2-3 zeigt, dass die Bindungskonstante von der Stöchiometrie des Komplexes abhängig ist. Diese kann mit Hilfe des sogenannten Job-Plots bestimmt werden, einer Methode der kontinuierlichen Variation der Konzentrationen von Rezeptor und Substrat. Experimentell wird die Absorption von Lösungen bestehend aus unterschiedlichen Rezeptor-Substrat-Zusammensetzungen bestimmt, wobei die Gesamtsumme beider Konzentrationen aus  $[R]_0$  und  $[S]_0$  jeweils konstant ( $\alpha$ ) bleibt. Während der Titration wird  $[S]_0$  von 0 bis  $\alpha$  variiert und anhand der Absorption die Komplexkonzentration  $[C]$  bestimmt.

Dabei gelten folgende Gleichungen:

$$\alpha = [R]_0 + [G]_0 \quad \text{Gl. 2-4}$$

$$A_{obs} = \varepsilon_H [R]_0 + \varepsilon_g [S]_0 + \Delta\varepsilon [R_a S_b] \quad \text{Gl. 2-6}$$

Trägt man nun  $[R_a S_b]$  gegen  $\frac{[H]_t}{[H]_t + [S]}$  auf, so kann man über das Maximum die

Stöchiometrie mit  $x = \frac{a}{a+b}$  ablesen. Für einen 1:1-Komplex zeigt sich für die Kurve entsprechend Abb. 2-31 folgender Verlauf.

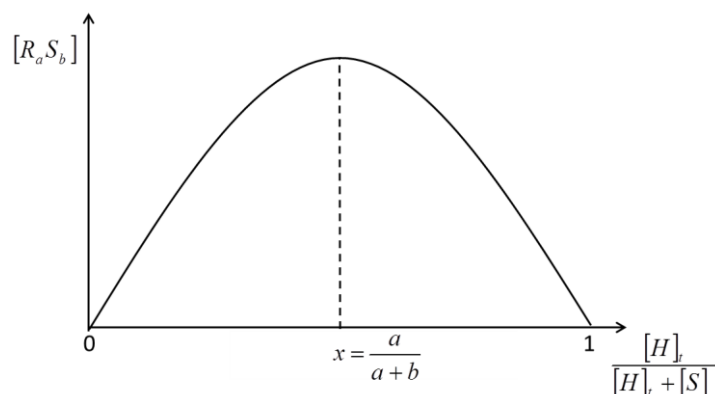


Abb. 2-31 Job-Plot zur Ermittlung der Komplexstöchiometrie.

Die UV/Vis-Spektroskopie eignet sich im Gegensatz zu anderen Methoden für die Bestimmung von Bindungskonstanten von 1:1-Komplexen in einem Bereich kleiner  $10^5$  und damit einer optimalen Startkonzentration des Rezeptors von 0.01 mM. Als Faustregel gilt:  $[R]_0 \cdot K_{Ass} \leq 1$ . Die Konzentration des Substrates wird dann so angepasst, dass durch die Titration eine Komplexbildung in einem Bereich von 20 – 80 % erreicht wird. Dies trägt zu einer korrekten Bestimmung der Assoziationskonstanten bei.<sup>78</sup>

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten mit Hilfe einer UV/Vis-Titration wird die Intensität der elektronischen Absorptionsbande bei einer bestimmten Wellenlänge bzw. in einem Wellenlängenbereich beobachtet, welche charakteristisch entweder für den Komplex, das freie Substrat oder den freien Rezeptor ist. Wie in Abb. 2-32 dargestellt addieren sich die Spektren des Rezeptors, des Substrats und des Komplexes zu einem Gesamtspektrum.

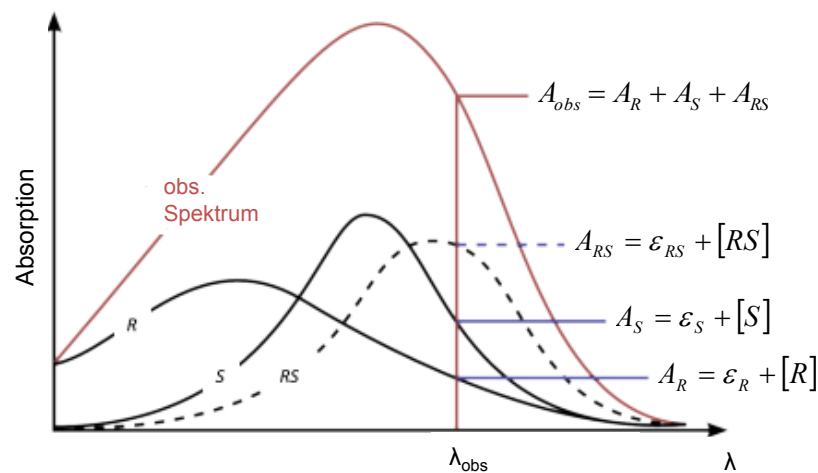


Abb. 2-32 Das während einer Titration beobachtete Absorptionsspektrum setzt sich aus den Einzelspektren der verschiedenen Komponenten zusammen, wenn das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt:  $A_{obs} = A_R + A_S + A_{RS}$ .

Durch das Auftragen der Absorption in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wird ein Plot generiert aus welchem z. B. mit *Specfit* mit Hilfe einer nicht-linearen Regression auf Basis der Gleichung Gl. 2-3 die Bindungskonstante bestimmt werden kann.

$$A_{obs} = A_R + A_S + A_{RS}$$

## 2.7.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Bestimmung von Komplexbildungskonstanten findet auch die Mikrokalorimetrie und hier speziell die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) Anwendung. Damit kann man die Wechselwirkung zwischen supramolekularen kleinen Komplexen in Lösung bei konstanter Temperatur bestimmen und insbesondere für die Messung von biologischen Makromolekülen stellt sie die Methode der Wahl dar.<sup>80</sup> Das Prinzip beruht darauf, dass bei der Bildung eines Rezeptor-Substrat-Komplexes entweder Wärme verbraucht oder freigesetzt wird.

Die physikalische Theorie liefert die Gibbs-Helmholtz-Gleichung, in der die Abhängigkeit der freien Enthalpie von der Enthalpie, der Temperatur und der Entropie mit Gl. 2-8 beschrieben wird.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Gl. 2-8

Daraus lässt sich die Assoziationskonstante  $K_{\text{Ass}}$  mit Gl. 2-11 ableiten.

$$\Delta G = -RT \ln K_{\text{Ass}}$$

Gl. 2-11

Auf dieser Grundlage wird mit einem vollautomatischen Isothermalen Titrationskalorimeter die konzentrierte Lösung eines Substrates über eine Spritze zu einer Lösung des Rezeptors titriert. Dabei wird die Wärmemenge bestimmt, welche durch die Komplexbildung entsteht bzw. aufgenommen wird. Der detaillierte Aufbau ist in Abb. 2-33 dargestellt.

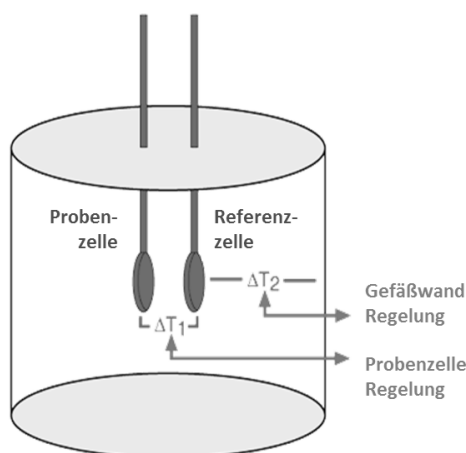


Abb. 2-33 Zwei identische Zellen befinden sich in einer adiabatischen Kammer. Die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Zellen  $\Delta T_1$  wird über ein Heizelement an der Referenzzelle auch bei Temperaturänderungen in der Probenzelle konstant gehalten.

Die Temperaturdifferenz zwischen Probenzelle und Referenzzelle wird permanent gemessen und über Heizelemente an der Referenzzelle reguliert, um kleinste Temperaturdifferenzen  $\Delta T_1$  zwischen den Zellen auszugleichen. D. h. bei einer exothermen Reaktion, bei der Wärme frei wird, muss die Spannung an der Referenzzelle verringert werden, bei einer endothermen Reaktion dagegen erhöht werden. Diese Änderung wird vom Kalorimeter gemessen und in  $\mu\text{cal}$  gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen. Für exotherme Reaktionen sind die Ausschläge also negativ (siehe Abb. 2-34 oben), für endotherme Reaktionen positiv. Die Wärmemenge  $Q$ , welche bei der Bildung verschiedener Komplexe  $R_aS_b$  entsteht, kann durch Gl. 2-13 beschrieben werden.

$$Q = \sum \Delta H_{ab} \cdot V \cdot [R_a S_b] = \sum \Delta H_{ab} \cdot n(R_a S_b)$$

Gl. 2-13

Damit ist die Wärmemenge proportional zur Änderung der Reaktionsenthalpie  $\Delta H$  multipliziert mit der Stoffmenge des gebildeten Komplexes  $n(R_aS_b)$ .



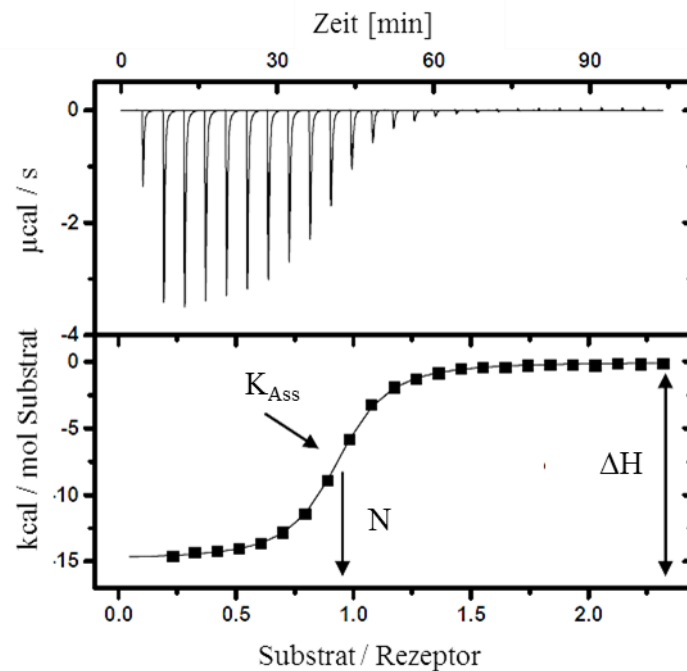


Abb. 2-34 Eine typische Bindungsisotherme. Oben: Rohdaten der Messung. Unten: Bindungsisotherme erhalten durch die Auftragung der integrierten Peaks gegen das Molverhältnis von zugegebenem Substrat zu Rezeptor in der Zelle.

Über die schrittweise Zugabe wird ein Wärmesignal aufgenommen und die daraus bestimmte erste Ableitung von  $Q$  in Abhängigkeit von  $[S]_0$  wird gegen das molare Verhältnis von  $[S]_0/[R]_0$  aufgetragen. Dies führt zu den bekannten sigmoiden Titrationskurven mit deren Hilfe die Stöchiometrie  $N$ , die Assoziationskonstante  $K_{Ass}$  und die Enthalpie  $\Delta H$  in einem Experiment mittels nicht-linearer Regression bestimmt werden können. Die zusätzlichen Informationen zum thermodynamischen Profil einer Komplexbildung können detailliertere Informationen über Konformationsänderungen oder die Art der Komplexbildung liefern.

Im Vergleich zu anderen Techniken ist die ITC sehr sensitiv, schnell und eine stellt eine direkte Methode ohne die Notwendigkeit nach chemischer Modifikation oder Immobilisation dar.<sup>81</sup> Eine ITC-Messung kann in allen Lösemitteln und Lösemittelgemischen durchgeführt werden, wobei man bei Verwendung von Lösemittelgemischen darauf achten sollte, dass dadurch keine zusätzlichen Mischungswärmen auftreten.

Ein großer Vorteil ist auch die automatisierte Durchführung des Experiments, wobei die Probenvorbereitung dafür höchste Aufmerksamkeit erfordert und die Methode recht anfällig gegenüber minimalen Verunreinigungen oder auch der Bildung von Luftblasen ist. Es ist auch zu berücksichtigen, dass die Menge an Substanzen für eine Messung, mit den notwendigen

Kontrollmessungen, einer supramolekularen Komplexbildung üblicherweise im millimolaren Bereich liegt und damit zu einem recht hohen Substanzverbrauch führt.

Trotz der vorhandenen Nachteile stellt die ITC eine herausragenden Methode dar, mit welcher mittels weniger Experimente eine Vielzahl von Informationen bezüglich einer Rezeptor-Substrat-Komplexierung gewonnen werden können.<sup>81–84</sup>

### 2.7.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie bietet die Möglichkeit, die Struktur des gebildeten Komplexes direkt zu veranschaulichen. Und das ist je nach Gerät, Standort und Probenvorbereitung mit einer Auflösung von 0.1 Å möglich und somit sogar ausreichend, um einzelne Atome abzubilden. Ihr Vorteil im Vergleich zu anderen Rastersondenmikroskopieverfahren (SPM, *scanning probe microscopy*) liegt darin, dass auch das Abtasten von nichtleitenden Materialien möglich ist, unter Atmosphärendruck gearbeitet werden kann und damit auch physiologische Bedingungen untersucht werden können. Dieses Mikroskop generiert ein Bild indem die Oberfläche mit einer mikrometerlangen Spitze abgetastet wird, welche sich an einer beweglichen Blattfeder dem sogenannten Cantilever befindet. Bringt man nun diese Spitze in die Nähe der Probenoberfläche, so bewirken anziehende und abstoßende atomare Kräfte ein Verbiegen des Cantilevers, welches detektiert und in ein Höhenprofil umgewandelt werden kann.

Die dabei auftretenden Kräfte und deren Vorzeichen sind abhängig vom Abstand zwischen der Spitze und der Oberfläche (Abb. 2-35). Werden Spitze und Atom einander angenähert treten Van-der-Waals-Wechselwirkungen auf, welche bis zu einem Maximum zunehmen. Dann wird die Abstoßen durch die beiden Elektronenwolken zu dominant und die Wechselwirkung nimmt sehr steil ab. Dieser Bereich wird als Kontakt-Region bezeichnet. Hier können die Atome nicht näher gebracht werden, da sich stattdessen der Cantilever verbiegt. Diese Verformung wird mithilfe von Laserlicht gemessen, welches auf der Oberfläche des Cantilevers reflektiert und durch einen Spiegel auf einen Photodetektor projiziert wird.

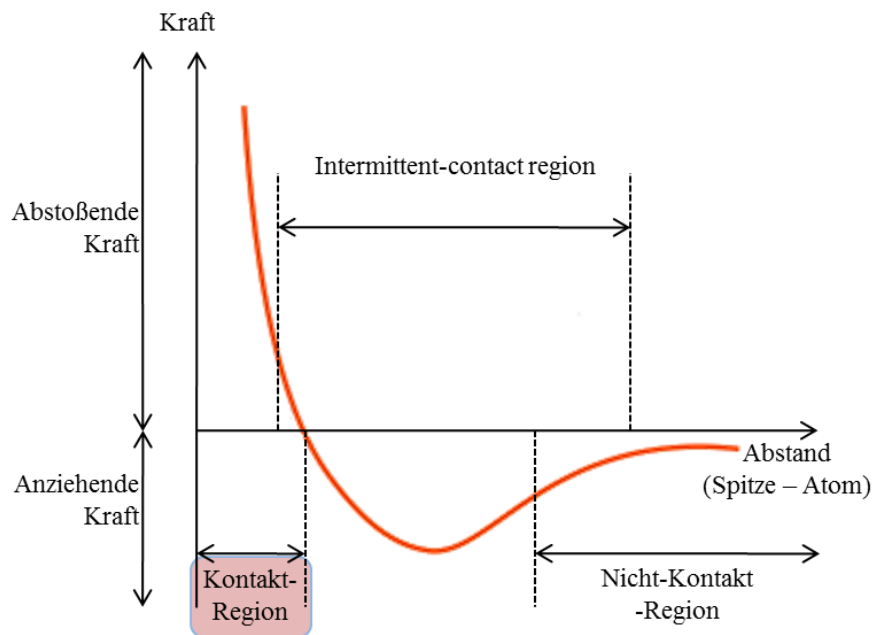


Abb. 2-35 Austragung der Kraft in Abhängigkeit zum Abstand zwischen Spitze und Atom.

In Abhängigkeit vom Abstand zwischen Spitze und Oberfläche können drei verschiedene Methoden unterschieden werden, der Kontakt-Modus, Nicht-Kontakt-Modus und der Semikontakt-Modus (*intermittent-contact*, *tapping-mode*). Letzterer wird im Folgenden beschrieben, da dieser auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Beim Semikontakt-Modus befindet sich die Spitze sowohl im steilen Bereich der Kontakt-Region als auch im Bereich der Nicht-Kontakt-Region (Abb. 2-35). Im Unterschied zu Nicht-Kontakt-AFM wird der schwingende Cantilever so nah an die Oberfläche gebracht, dass die Oberfläche durch die Schwingung berührt wird. Aus der Veränderung der Schwingungsfrequenz bzw. -amplitude wird ein Abbild der Oberflächentopographie erhalten. Die Oberfläche wird dabei nicht beschädigt. Neben einem Höhenprofilbild kann durch die Messung mit einem schwingenden Cantilever auch ein Phasenbild erzeugt werden. Daraus können direkt die unterschiedlichen Härtegrade der gemessenen Probe abgelesen werden.

AFM ermöglicht die Untersuchung von biologisch relevanten Proben, darunter ist die DNA eines der meist vermessenen Biopolymere. Da die Auflösung einer Messung vom Härtegrad einer Probe abhängig ist und für sehr weiche Proben abnimmt, stellt eine Messung von biologischen Makromolekülen eine große Herausforderung dar. Bisher gelang es nur sehr selten, die große Furche der DNA darzustellen. Als erstes stellt sich die Frage, wie die DNA auf der Oberfläche immobilisiert werden soll. Idealerweise sollte eine solche Bindung an der Oberfläche stabil genug sein, um ein Schleifen durch die Spitze zu verhindern. Dennoch sollte die Probe noch so viel Bewegungsfreiheit haben, um die natürliche Konformation und idealerweise auch Funktionalität beizubehalten. Für die DNA hat sich dabei Mica als

geeignete Oberfläche erwiesen. Ein Silicat, welches eine sehr flache atomare Oberfläche mit negativen geladener Oberfläche durch exponierte OH-Gruppen vorweist. DNA-Immobilisation wird dadurch erreicht, dass bivalente Kationen in Lösung z. B.  $Mg^{2+}$ , welche als Brücke zwischen der negativ geladenen Mica-Oberfläche und dem negativ geladenen DNA Phosphatrückgrat dienen, eingesetzt werden.<sup>85</sup>

#### 2.7.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung stellt eine Methode zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung kolloidaler Stoffe dar. Solange sich einzelne Teilchen einer Dispersion unabhängig voneinander im umgebenden Medium bewegen können, liefert die Brown'sche Bewegung der Teilchen genaue Informationen über die Partikelgröße. Dabei wird die Diffusionskonstante bestimmt, welche proportional zum Quotienten aus Temperatur und dem Produkt der Viskosität und Teilchengröße ist (Gl. 2-16).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad \text{Gl. 2-16}$$

Je größer das Teilchen ist, desto langsamer bewegt es sich. Die Bewegung der Teilchen überträgt sich als Intensitätsfluktuation auf das Lichtstreusignal. Aus der Analyse dieser Fluktuationen des Interferenzmusters in Abhängigkeit von der Zeit erhält man die Geschwindigkeit der Teilchen in Lösung und daraus den Diffusionskoeffizienten D. Durch Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 2-16) mit der Boltzmannkonstante  $k_B$ , der absoluten Temperatur T und der Viskosität des Lösemittels  $\eta$  erhält man schließlich den hydrodynamischen Radius r. Als Qualitätsmerkmal einer Messung kann der Polydispersionsindex (PDI) angesehen werden, welcher einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann und möglichst gering sein sollte.

Im Vergleich zur Rasterkraftmikroskopie erhält man hier den hydrodynamischen Radius, nicht aber genaue Informationen zur Struktur.

### 2.7.5 Thermische Denaturierung

Zur Bestimmung einer DNA-Bindung mit einem niedermolekularen Liganden gibt es eine Anzahl verschiedener Methoden, wie z. B. die thermische Denaturierung, der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, ITC oder mehrere spektroskopische Methoden. Eine relativ einfache, empfindliche und gut reproduzierbare Methode stellt die UV-spektroskopische Analyse der Schmelzkurven dar.

Wird eine Lösung bestehend aus Polynucleotiddoppelsträngen erhitzt, so dissoziiert der Doppelstrang bei einer charakteristischen Temperatur ( $T_m$ , *melting temperature*) in zwei Einzelstränge. Dabei macht man sich zu Nutze, dass der Absorptionskoeffizient eines Doppelstranges aufgrund der Basenstapelung geringer ist als die Summe der Absorptionskoeffizienten der einzelnen Nucleobasen eines Einzelstranges. Damit ist es möglich, die thermische Denaturierung in Abhängigkeit von der Temperatur zu verfolgen. Die Lage des Schmelzpunktes ist sowohl abhängig von der Zusammensetzung der DNA-Basen als auch von der Ionenstärke und dem pH-Wert des verwendeten Mediums. Moleküle, welche über nichtkovalente Bindungen mit der Doppelhelix interagieren, ändern die Schmelztemperatur, je nachdem, ob sie stabilisierend oder destabilisierend wirken.

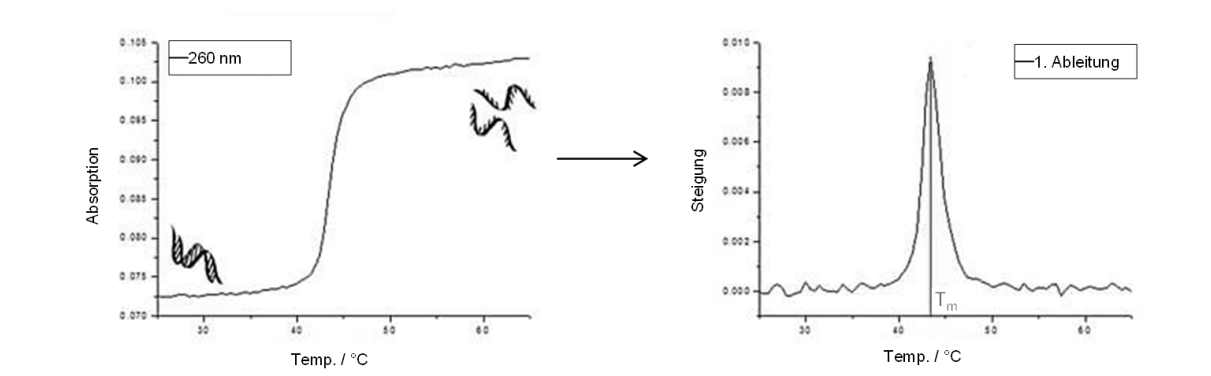


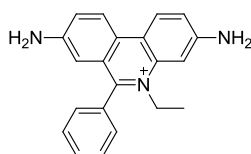
Abb. 2-36 Thermisches Denaturierungsexperiment einer beispielhaften doppelsträngigen Nucleinsäure (links) und Berechnung der charakteristischen Schmelztemperatur über die erste Ableitung.

Zur Ermittlung der Schmelztemperatur wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche graphische Methoden verwendet. Zum einen die Auftragung der Temperatur gegen die erste Ableitung der gemessenen Absorption, welche am Maximum die Lage des Wendepunktes anzeigt (Bestimmung mit *Origin*) und zum anderen eine grafische Bestimmung über sich schneidende Asymptoten. Hierbei wurden an die gerade verlaufenden Enden der Schmelzkurven Asymptoten gelegt und eine Ausgleichsgerade durch den steilen Anstieg der Schmelzkurve gelegt. Der Mittelwert der Schnittpunkte dieser Geraden mit den beiden Asymptoten ergibt den gesuchten Wendepunkt.<sup>86</sup> Substanzen, die mit der DNA wechselwirken, binden an doppelsträngiger DNA meist stärker als an den Einzelsträngen. Das

stabilisiert die Doppelhelix und bewirkt eine Erhöhung der charakteristischen Denaturierungstemperatur. Typisch ist dieses Verhalten für Interkalatoren, welche sich zwischen den gestapelten Basenpaaren einlagern. Dies kann jedoch auch für Furchen-Binder beobachtet werden. Substanzen, welche dagegen an einzelsträngiger DNA binden, führen zu einer Abnahme von  $T_m$ , was z. B. für *cis*-Platin der Fall ist.<sup>87</sup> Eine Bestimmung der Affinität über einen Anstieg der Schmelztemperatur ist jedoch nicht so einfach, obwohl natürlich eine gewisse Korrelation gegeben ist. Es spielen hier jedoch auch andere Faktoren wie die Anzahl der Bindungsstellen, Kooperativität und die Affinität des Liganden gegenüber eines Einzelstranges eine Rolle.<sup>88</sup>

### 2.7.6 Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Ethidiumbromid **35** ist ein roter Phenanthridin Farbstoff und ist bekannt dafür, Komplexe mit DNA und RNA auszubilden.<sup>89</sup> Dabei aggregiert er als Interkalator und schiebt sich parallel zu den Nucleobasen zwischen jeden dritten bis vierten Zwischenraum (0.33 Äquivalente **35** pro Basenpaar).<sup>90</sup> Beobachtet wird das durch eine Erhöhung seiner Fluoreszenz im UV-Bereich. Dabei findet ein hydrophober Transfer des Interkalators vom Lösemittel in die Bindungsstelle statt. Durch die Freisetzung von Wasser Molekülen und Gegenionen ist dieser Vorgang entropisch begünstigt. Im Gegenzug dazu erfährt das System enthalpische Einbußen aufgrund der notwendigen Konformationsänderung der Nucleinsäure. Positiv wirken sich  $\pi$ - $\pi$ -Stapel- und Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und eine durch die Konformationsänderung bedingte Reduktion der Coulomb-Abstoßung zwischen den Phosphaten aus. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze bei der DNA-Färbung von Agarosegelen und als Methode zur Bindungsanalyse von DNA-Liganden. Der Ethidiumbromid-Verdrängungsassay stellt zur Abschätzung der Affinität zwischen DNA und Rezeptor eine rasche und reproduzierbare Methode dar. Ein großer Vorteil z. B. im Vergleich zur ITC sind die geringen Mengen an Substanz, welche eingesetzt werden. Die Rahmenbedingungen für eine erfolgreiche Durchführung erfordern, dass der Rezeptor keine Absorption bei der Anregungswellenlänge (560 nm) und der emittierenden Fluoreszenz aufweist.



**35**

Man erhält einen  $C_{50}$ -Wert, aus dem man die mikromolare Konzentration bestimmen kann, bei welcher nur noch 50 % an Fluoreszenz-Intensität detektiert wurden, d. h. der Punkt an dem die Hälfte des gebundenen Ethidiumbromids ersetzt wurde.<sup>91</sup> Im einfachsten Fall wird angenommen, dass alle DNA-Bindungsstellen äquivalent sowohl für den Rezeptor als auch für Ethidiumbromid sind. Wenn die Konzentration an freiem Ethidiumbromid im Gleichgewicht mit der Konzentration an gebundenem Ethidiumbromid und den freien DNA-Bindungsstellen ( $S_f$ ) steht, dann gilt für die Bindungskonstanten:

$$[E]_{frei} \cdot S_f \leftrightarrow [E]_{gebunden} \quad Gl. 2-19$$

$$K_E = \frac{[E_{gebunden}]}{[E_{frei}] \cdot [S_f]} \quad Gl. 2-20$$

$$K_R = \frac{[R_{gebunden}]}{[R_{frei}] \cdot [S_f]} \quad Gl. 2-21$$

Entsprechend gilt für die Bindungskonstante des zugefügten Rezeptors, welcher um dieselben Bindungsstellen konkurriert:

$$K_R = \frac{[R_{gebunden}] \cdot [E_{frei}] \cdot K_E}{[R_{frei}] \cdot [E_{gebunden}]} \quad Gl. 2-24$$

Dabei ist zu berücksichtigen, dass auch Rezeptoren mit Ethidiumbromid konkurrieren, die nicht interkalieren.





---

## 3 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

---

Die Entwicklungen in der Supramolekularen Chemie und der Rezeptor-Substrat-Chemie stellen viele neue Anforderungen an die organische Synthese. Das Design und die Synthese von chemischen Verbindungen, welche spezifische Funktionen erfüllen sollen, erfordern die Entwicklung von neuen Bindungsmotiven mit geeigneten Grundgerüsten, welche eine substratbezogene Präorganisation erlauben. In der organischen Chemie geschieht es häufiger, dass schon vergessene Komponenten oder Phänomene auf einmal mit neuen Augen gesehen werden und aufgrund geänderter Rahmenbedingungen und auch Fragestellungen erneut interessant werden. Dies geschieht seit einigen Jahren mit den Calixarenen, welche von mehreren Forschungsgruppen auf ihr Potential für die Supramolekulare Chemie untersucht werden.<sup>53,92</sup> Dafür sind v. a. zwei Gründe für das große Interesse zu nennen. Zum einen kann die Synthese des Makrocyclus in großem Maßstab und in guten Ausbeuten durchgeführt werden, zum anderen liefert eine systematische Variation eine Verbindung mit der gewünschten Größe und Konformation. Eine Funktionalisierung ist selektiv entweder am *upper rim*, d. h. direkt am aromatischen Ring oder am *lower rim* und damit über die phenolische Hydroxygruppe möglich.

Dieses hohe Potential sollte nun auch in dieser Arbeit genutzt werden und über eine Verknüpfung mit den Eigenschaften des von *Schmuck* entwickelten Guanidinocarbonylpyrrol-Bindungsmotivs zu multifunktionalen Rezeptoren führen. Die synthetisierten Verbindungen sollten dann auf ihre Fähigkeit zur Erkennung von verschiedenen biologischen Substraten, wie z. B. Aminosäuren oder Nucleotide, aber auch Biopolymere wie das Protein P97 und DNA in wässriger Lösung untersucht werden. Ein weiteres Ziel im Rahmen dieser Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten Transportsystems für die Gentransfektion.

### Synthese eines tetravalenten Rezeptors auf Calixaren-Basis

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer geeigneten Syntheseroute für die Funktionalisierung eines Calixarens als Grundgerüst mit mehreren Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheiten (GCP) als Liganden (siehe Abb. 3-1). Als Ringgröße wurde ein Calix[4]aren mit vier phenolischen Einheiten gewählt, weil es zusammen mit Calix[6]arenen und Calix[8]arenen verhältnismäßig einfach zu synthetisieren ist, im Vergleich zu den größeren Derivaten in seiner Konformation aber eine geringere Flexibilität aufweist. Dieses Calix[4]aren sollte über einen Linker mit vier GCP-Molekül verknüpft werden. Mit diesem von *Schmuck* entwickelten Bindungsmotiv hat man einen multivalenten Rezeptor zur Verfügung, welcher in der Lage ist, Carboxylate auch in wässrigen Medien mit hoher Affinität und Selektivität zu komplexieren.<sup>53</sup> Variationsmöglichkeiten bestehen in der Auswahl des Linkers, zwischen aromatischem Kerngerüst und den GCP-Liganden, und der Funktionalisierung am *lower rim*.

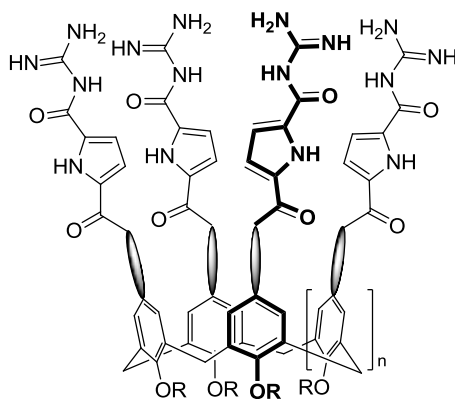


Abb. 3-1 Schematische Darstellung des Zielmoleküls. Calix[n]arene haben zwei Ränder, an denen sie funktionalisiert werden können und bieten damit eine sehr vielseitige Plattform zum Aufbau multivalenter Verbindungen an. (L: Alkyllinker; R: Alkylrest)

Dieser Aufbau soll sowohl die hohen Affinitäten des GCP-Bindungsmotivs gegenüber Oxo-Anionen nutzen, als auch über seine Multivalenz Proteinoberflächen unter physiologischen Bedingungen erkennen können. Zudem bildet es mit seinen Aromaten eine hydrophobe Kavität, welche sich für Rezeptor-Substrat-Wechselwirkungen vielfach ausgezeichnet hat.<sup>53</sup> Mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden hat man außerdem eine protonierbare Funktion mit einem  $pK_s$ -Wert zwischen 5 und 7, was auch unter physiologischen Bedingungen zu geladenen und damit sehr polaren Resten führt. Diese sind sowohl für die Erkennung des DNA-Rückgrats, als auch als komplementäre Bindungsstellen für die anionischen „hot spots“ auf einer Proteinoberfläche von großer Bedeutung.

### Bindungsstudien mit kleinen biologisch relevanten Substraten

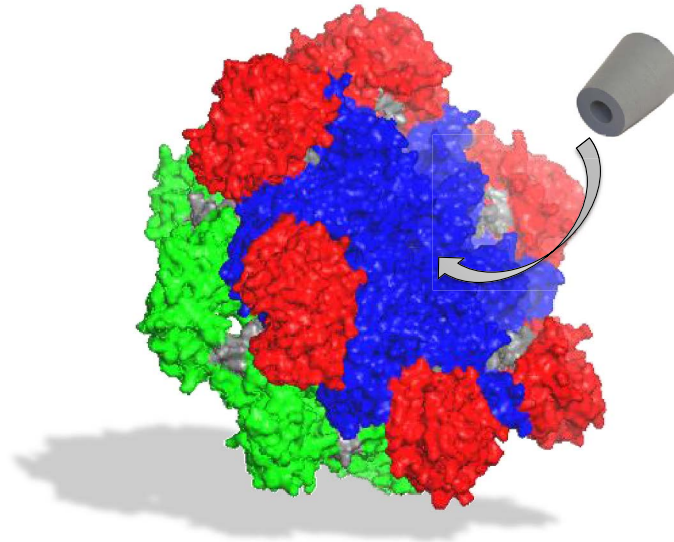
Obwohl natürlich die Bindungseigenschaften des GCP-Bindungsmotivs gut bekannt sind, ist seine Wirkungsweise als multivalenter Ligand, an einem nur eingeschränkt flexiblen Calixaren-Grundgerüst, noch nicht untersucht worden. Die Anforderung an diese Arbeit war es zu klären, welchen Einfluss die einzelnen Liganden aufeinander haben und wie diese die Bindungseigenschaften zu verschiedenen Substraten beeinflussen. Es stellte sich zudem die Frage, ob das Zielmolekül Selektivitäten für bestimmte Substanzklassen aufweist oder ob sogar Einschlussverbindungen gebildet werden können und damit auch die hydrophobe Kavität, trotz polarer Liganden, besetzt wird. Interessant ist dabei auch die Frage nach der Stöchiometrie der gebildeten Komplexe. Während nichtfunktionalisierte Calixarene eher zu 1:1-Einschlussverbindungen führen, könnte ein tetravalentes Molekül mit Liganden, welche auch zu mehrfachen und verschiedenen nichtkovalenten Wechselwirkungen in der Lage sind, zu einem anderen Ergebnis führen.

Um diese Fragen beantworten zu können, sollten Übersichtsmessungen unter Zuhilfenahme verschiedenster Substrate, JOB-Plot-Bestimmungen und UV/Vis-Bindungsstudien mit ausgewählten Substraten durchgeführt werden.

### Molekulare Erkennung von P97

Eine weitere Fragestellung wurde in Kooperation mit *Prof. Hemmo Meyer* vom ZMB der Universität Duisburg-Essen bearbeitet. Im Fokus stand hierbei das hexamere Protein P97, welches als ATPase eine bedeutende Rolle im Ubiquitinsystem spielt. *Meyer et al.* beschäftigen sich mit der Rolle von P97 bei der Mitose und untersuchen u. a. die Wechselwirkung zwischen P97 und seinen verschiedenen Cofaktoren.<sup>76,93</sup> Bekannt sind hierbei die zellulären Aufgaben von P97 in der Proteinqualitätskontrolle und Signalvermittlung, mit medizinischer Relevanz bei der Krebsentstehung und bei Alterungsprozessen. Noch nicht vollständig verstanden ist jedoch seine molekulare Funktionsweise. Dabei stellt sich zum einen die Frage, ob P97 seine zentrale Pore nutzt, um Substratproteine zu translozieren, zum anderen wie die Bewegungsdynamik der Pore mit der ATP-Hydrolyse gekoppelt ist. Als Bindungsstelle interessant ist dabei der Eingang der Pore aufseiten der D1-Domäne mit seinen 2·6 anionischen Aminosäuren (Glu 319, Glu 283) und einem relativ kleinen Durchmesser von 15 – 20 Å (siehe Abb. 3-2). Diese anionischen Bindungsstellen scheinen für das GCP-Bindungsmotiv ideal und durch die Multivalenz des Rezeptors wird eine große Flächenabdeckung und eine gleichzeitige oder kooperative Wechselwirkung über mehrere Positionen möglich.

Für diese Arbeit stellte sich damit die Frage, ob ein multivalenter Rezeptor mit GCP-Bindungseinheiten in der Lage ist, die Pore selektiv zu erkennen und zu verschließen und mit welcher Methode eine solche Wechselwirkung eindeutig nachzuweisen ist.



*Abb. 3-2 Darstellung des hexameren P97 mit seiner D1-Domäne in Blau, der endständigen N-Domäne in Rot und der D2-Domäne in Grün. Schematisiert ist der Verschluss des Eingangs der Pore innerhalb der D1-Domäne.*

Dabei sollten zunächst theoretische Berechnungen durchgeführt werden, um die Eignung eines Rezeptors bezüglich seiner Größe und Komplementarität zu prüfen. In Folge sollte für potentielle Kandidaten mit Hilfe der Isothermalen Titrationskalorimetrie eine mögliche Wechselwirkung quantitativ bestimmt werden. Im Rahmen der Kooperation ist auch die Durchführung eines ATPase-Assays zur Prüfung von Inhibitor-Eigenschaften auf die Hydrolyseaktivität geplant.

#### Darstellung eines synthetischen Vektors zur Gentransfektion

Eine weitere Zielsetzung im Rahmen dieser Arbeit befasste sich mit der Entwicklung von synthetischen Transportsystemen zur Transfektion von DNA in Zellen und damit zur möglichen Anwendung in der Gentherapie. Neueste Entwicklungen zur Verbesserung der Effizienz der Vektoren für die Gentherapie gehen in die *in-vivo*-Anwendung. DNA-Moleküle als Medikamente sind bereits Wirklichkeit, ihre Möglichkeiten sind bisher jedoch noch nicht vollständig ausgeschöpft.<sup>8</sup> Es wird intensiv nach Alternativen für die sehr effektiven aber mit Nebenwirkungen behafteten viralen Vektoren gesucht.

In diesem Sinne soll das Potential der in dieser Arbeit entwickelten Systeme bestehend aus einem mit GCP-Bindungsmotiven funktionalisierten Calixaren als synthetische nichtvirale Vektoren für die Gentransfektion ausgeschöpft werden.

Aus vorherigen Arbeiten im Arbeitskreis ist bekannt, dass die GCP-Einheit hohe Affinitäten zum DNA-Rückgrat aufweist und auch durch seine Protonierungseigenschaften für eine endosomale Freisetzung während der Gentransfektion geeignet ist.<sup>94–96</sup> Ziel dieser Arbeit ist es, zum ersten Mal ein mit vier GCP-Liganden funktionalisiertes amphiphiles Calixaren als Vektor für die Gentransfektion einzusetzen. Aus *Ungaros* Arbeiten weiß man, dass ein sehr lipophiles Calixaren mit Guanidiniumgruppen zu einer Aggregation der DNA und, unter Einsatz eines Helferlipides, zur Gentransfektion führen kann.<sup>73</sup>

Hier soll das Calixaren-Grundgerüst mit Octylresten verethert werden und die Eigenschaften der GCP-Gruppe für eine Aggregation der DNA und eine Gentransfektion untersucht werden.

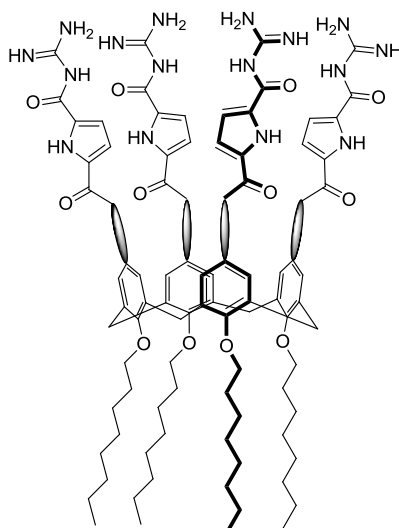


Abb. 3-3 Lipophile Zielstruktur zum Einsatz als synthetischer Vektor für die Gentransfektion.

Hierzu sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Knauer* vom ZMB der Universität Duisburg-Essen Transfektionsstudien durchgeführt werden. Als Vergleichssubstanz sollte auch ein Hydroxycalixaren untersucht werden, um die Notwendigkeit der lipophilen Reste zu verifizieren.

Zudem sollten die Bindungseigenschaften mit generischer ctDNA anhand von verschiedenen Methoden, wie der thermischen Denaturierung und einem Ethidiumbromid-Verdrängungsassay, untersucht werden, um erste Einblicke auf einen möglichen Bindungsmodus zu erhalten.

Insgesamt ist das Ziel dieser Arbeit, die Wirksamkeit von multivalenten Calixaren-basierten Rezeptoren mit GCP-funktionalisierten Einheiten, als Rezeptoren zur Erkennung von biologisch relevanten Substraten zu untersuchen.

---

## 4 DURCHFÜHRUNG UND DISKUSSION

---

Im folgenden Kapitel wird zunächst die synthetische Entwicklung eines neuen multivalenten Rezeptors beschrieben, bei dem zum ersten Mal das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv mit einem Calixaren-Grundkörper kombiniert wurde. Daraufhin folgt die Untersuchung seiner Eigenschaften, gefolgt von Bindungsstudien mit verschiedenen Oxo-Anionen, darunter v. a. Aminosäuren und Nucleotide. Im Anschluss werden die ersten Entwicklungen zur Untersuchung einer Oberflächenerkennung des Proteins P97 vorgestellt. Der darauffolgende Abschnitt beschreibt die auf diesen Ergebnissen basierende Entwicklung eines weiteren Rezeptors mit veränderten Eigenschaften, welcher für die Gentransfektion konzipiert wurde. Beide Rezeptoren wurden schließlich auf ihr Potential zur Wechselwirkungen mit ctDNA untersucht.

### 4.1 EIN MULTIVALENTER REZEPTOR ZUR ERKENNUNG VON OXO-ANIONEN AUF EINER PROTEINOBERFLÄCHE

Im Folgenden wird die Entwicklung eines multivalenten Rezeptors vorgestellt, welcher aus einem Calixaren als Grundgerüst und Guanidiniocarbonylpyrrol-Einheiten (GCP) als Liganden aufgebaut wurde (siehe Abb. 4-1). Die dabei auftretenden Schwierigkeiten werden erläutert und Verbesserungen diskutiert.

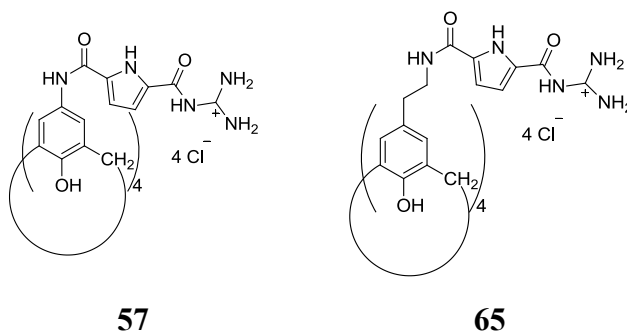


Abb. 4-1. Übersicht der angestrebten Moleküle mit dem Ziel, ein Calix[4]aren mit GCP-Einheiten zu funktionalisieren.

#### 4.1.1 Synthese eines flexiblen bipolaren Rezeptors 65

In diesem Abschnitt wird zunächst die Synthese des GCP-Bindungsmotivs vorgestellt, gefolgt von dem Aufbau des Calix[4]arenes und schließlich der Verknüpfung von beiden.

Für die Darstellung des Guanidinocarbonylpyrrol-Liganden wurde eine im Arbeitskreis *Schmuck* bewährte und mehrfach optimierte Syntheseroute verwendet.<sup>97</sup> Die Darstellung des 1*H*-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäure-Monobenzylesters **42** erfolgte dabei ausgehend vom Pyrrol, welches mit Trichloracetylchlorid **37** zum Pyrrol **38** umgesetzt wurde. Mit Natriumbenzylat fand eine Haloformreaktion statt, welche unter Abspaltung von Chloroform zum Ester **39** führte. Unter Einsatz eines frisch synthetisierten Vilsmeier-Reagenzes wurde das Pyrrol in 4- und 5-Position formyliert und daraus **40** isoliert. Dieser Aldehyd wurde mit Kaliumpermanganat zur Carbonsäure **42** oxidiert.

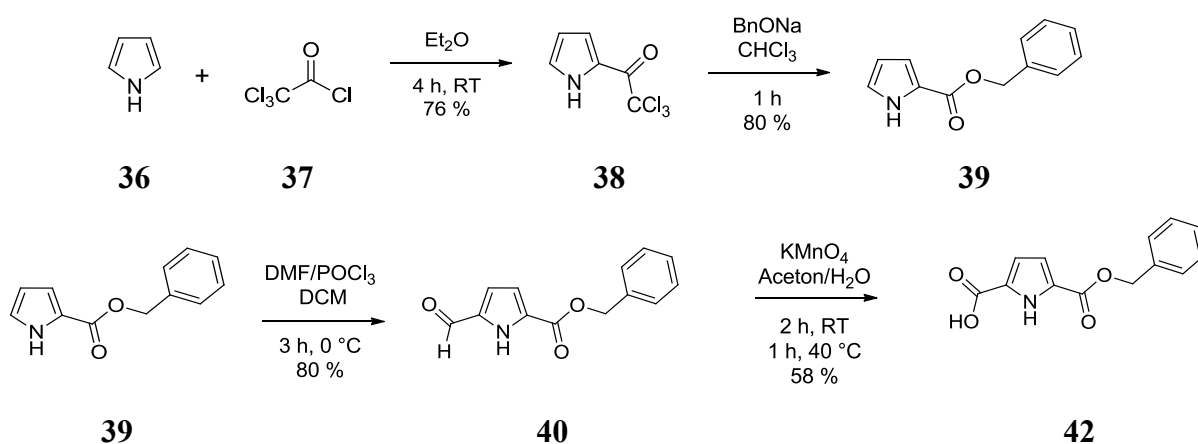


Abb. 4-2 Darstellung des 1*H*-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäure-Monobenzylesters **42**.<sup>97</sup>

Parallel dazu wurde *N*-Boc-Guanidin **45** synthetisiert<sup>98</sup> und dieses unter Einsatz des Kupplungsreagenzes PyBOP mit **42** gekuppelt. Das Produkt wurde mit Palladium auf Aktivkohle hydrogenolysiert und damit die *Z*-Schutzgruppe entfernt und das Triethylammoniumsalz des Carboxylates **48** hergestellt. Zur weiteren Reinigung wurde das Triethylammoniumsalz über Nacht in kaltem Diethylether suspendiert und dabei die freie Carbonsäure erhalten. Auf diese Weise konnten unerwünschte Verunreinigungen aus der vorherigen Kupplung entfernt werden. Die Synthesen verliefen in sehr guten Ausbeuten und die jeweiligen Produkte ließen sich problemlos und in größerem Maßstab isolieren.

Damit stand ein Ligand zur Verfügung, dessen strukturelle Eigenschaften sehr gut geeignet sind, Carboxylate auch in wässrigen Medien zu komplexieren und welcher eine freie Carbonsäure zur Verknüpfung mit dem Calix[4]aren-Grundgerüst aufweist.



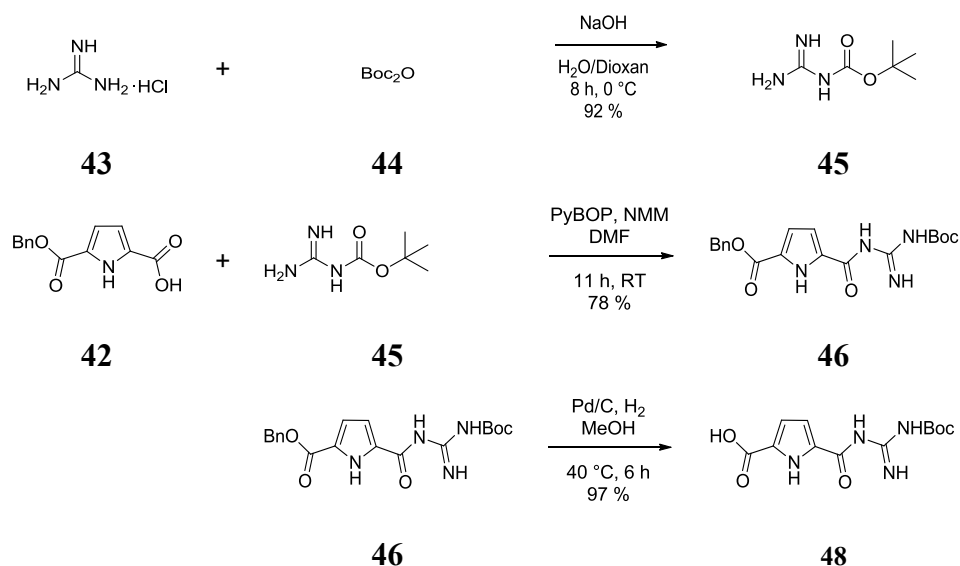


Abb. 4-3 Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol-Linkers **48**.

Für das Calix[4]aren-Grundgerüst wurde ausgehend von *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren eine Synthesestrategie entwickelt, um die GCP-Liganden mit dem Aromaten zu verbinden. Die schnellste und einfachste Möglichkeit schien zunächst die Funktionalisierung des Calixarens in *para*-Position mit einem Amin und die Verknüpfung über eine Peptidbindung (siehe Abb. 4-4). Zudem erhält man auf diese Weise eine weitere Amidbindung, welche die Polarität des Moleküls erhöht und eine zusätzliche Bindungsstelle zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken bereitstellt. Eine direkte Bildung des Tetranitrocalix[4]arens **55** aus *p*-Nitrophenol mit Formaldehyd konnte bisher nicht erreicht werden.<sup>99</sup> Also wurde zunächst das *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren aufgebaut, dieses nitriert und die Nitrogruppe zum Amin reduziert, womit die Kupplung mit **48** angestrebt wurde (Abb. 4-4).

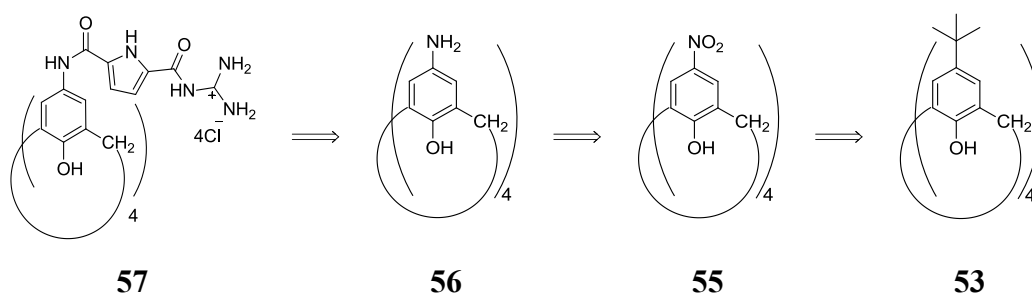


Abb. 4-4 Retrosynthese des Zielmoleküls **57**.

Eine neue Herausforderung war der synthetische Aufbau des Calix[4]arens und dessen Funktionalisierung mit einem Amin für die Kupplung mit GCP **48**. Calixarene können prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen synthetisiert werden. Beim ersten handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess von *Hayes* und *Hunter*, welcher von *Kämmerer* im Laufe der Zeit optimiert wurde.<sup>100</sup> Hierbei wird jedes Phenol einzeln verknüpft und der Ring bei

gewünschter Kettenlänge geschlossen. Der zweite Weg stellt eine basenkatalysierte Kondensation eines *p*-substituierten Phenols mit Formaldehyd dar, welche als Eintopfsynthese praktiziert werden kann. Diese wurde zunächst von *Zinke* entwickelt und später von *Cornforth*, *Patrick* und *Egan* modifiziert. In den ersten Jahren war diese Reaktion jedoch nicht zuverlässig und wenig reproduzierbar. Die Problematik konnte *Gutsche* schließlich aufklären, indem er herausfand, dass die bisherigen Prozeduren zu einer Mischung aus cyclischen Oligomeren führten, welche sehr schwer zu isolieren waren. Entscheidend sind der Einsatz von Phenolen mit sperrigen tertiären *para*-Substituenten als Edukt, die Reaktionstemperatur, die Anzahl an Äquivalenten der Base und die Wahl des Gegenions.<sup>101</sup> *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren **53** wurde in dieser Arbeit also nach der modifizierten *Zinke-Cornforth-Prozedur* synthetisiert. In einer elektrophilen aromatischen Substitution von *p*-*tert*-Butylphenol **51** mit Formaldehyd **52** wurde der sogenannte *Precursor* in wässrigem alkalischem Milieu hergestellt. Dabei wurden 0.045 Äquivalente Natriumhydroxid in Bezug auf das Phenol am Anfang zugegeben. Dieser *Precursor*, welcher hauptsächlich aus linearen Oligomeren besteht, wurde zur eigentlichen Ringbildung in Diphenylether gelöst und einer Pyrolyse bei Temperaturen von 258 °C unterzogen. Das entstandene Produkt wurde mit Essigester ausgefällt und *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren **51** entsprechend der Literatur in einer Ausbeute um 60 % als nahezu farbloser, kristalliner Feststoff isoliert (Abb. 4-5).

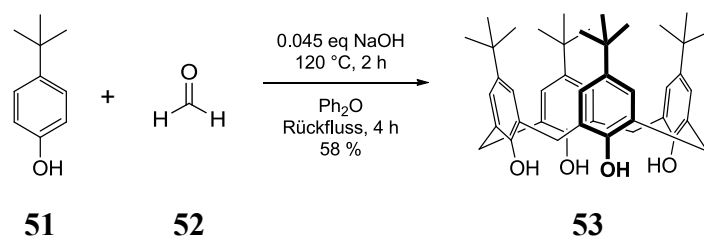


Abb. 4-5 Darstellung des *p*-*tert*-Butylcalix[4]arens **53**.

Ein entscheidender Schritt bei der Synthese ist das Mörsern der Edukte, da ansonsten die Ausbeute der Reaktion drastisch sinkt. Zur Entfernung des entstehenden Wassers, während des Ringschlusses, wurde ein inverser Wasserabscheider oder ersatzweise ein Tropftrichter mit Überdruckleitung eingesetzt. Es ist wichtig das Wasser vollständig zu entfernen, wobei man darauf achten sollte, dass jedes Zurücktropfen zu einem sehr starken Aufschäumen der Reaktionsmischung führt, weshalb auch ein relativ großes Reaktionsgefäß eingesetzt wurde. Die Reinheit des, durch Ausfällens und mehrmaligen Waschens mit verschiedenen Lösemitteln, erhaltenen Rohprodukts war ausreichend für die folgenden Synthesen. War eine Umkristallisation jedoch notwendig, wurde dafür Toluol als Lösemittel verwendet, was aber zu einem 1:1-Komplex unter Einschluss eines Toluol Moleküls führte. Für eine Entfernung

von Toluol sind hohe Temperaturen und ein Ölpumpenvakuum über einen längeren Zeitraum notwendig. Betrachtet man das  $^1\text{H}$ -NMR von **53** in Abb. 4-6 sieht man, dass die Methylenprotonen das charakteristische Resonanzmuster aus zwei Dubletts für die *cone*-Konformation zeigen. Diese sind jedoch bei Raumtemperatur bereits etwas verbreitert. Die Koaleszenztemperatur  $T_c$  liegt für *p*-*tert*-Butylcalix[4]arene **51** in Chloroform bei 52 °C, in DMSO aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrücken bei 18 °C.<sup>29</sup> Die Synthese ist unter Beachtung der genannten Punkte in Ansätzen bis zu 35 g gut durchführbar. Damit stand das Grundgerüst eines Calix[4]arens für weitere Funktionalisierungen zur Verfügung.

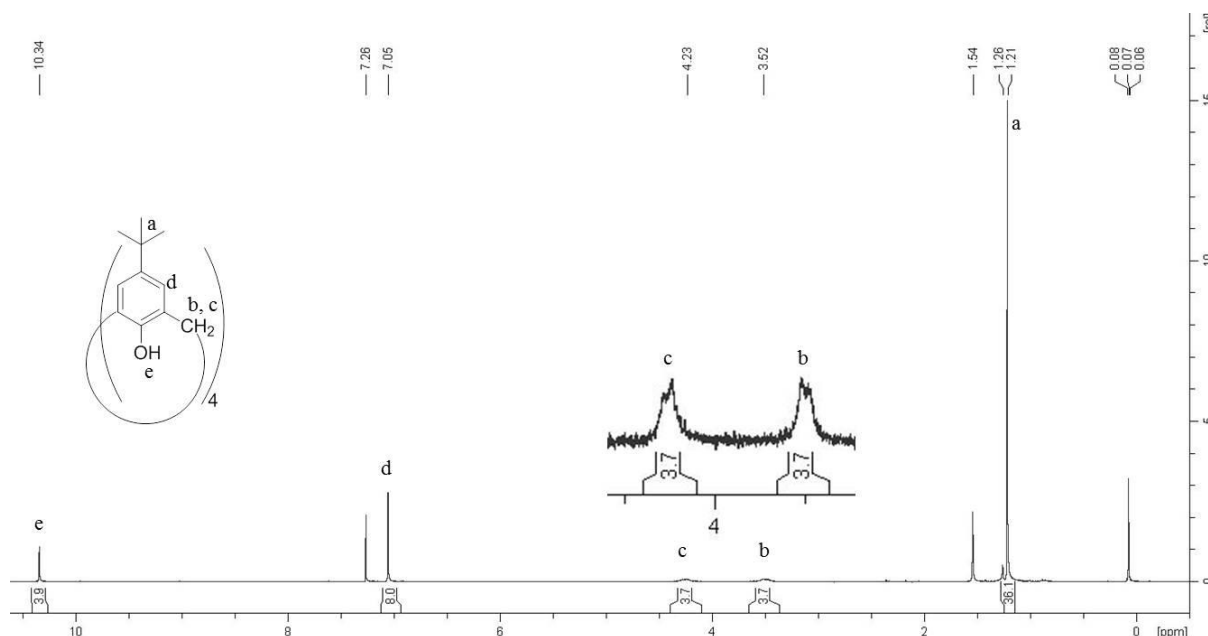


Abb. 4-6  $^1\text{H}$ -NMR des *p*-*tert*-Butylcalix[4]arens **51** zur Veranschaulichung der *cone*-Konformation.

Zur Einführung einer Nitrogruppe am oberen Rand des Calixarenes wurde der direkte Weg über eine *ipso*-Substitution des *p*-*tert*-Butylcalix[4]arens gewählt. Nach *Reinhoudt et al.* ist dabei der Einsatz von rauchender Salpetersäure aufgrund der geringen Löslichkeit ungünstig. *Wang et al.* entwickelten einen Weg unter Einsatz von konzentrierter Salpetersäure sowie auch sehr milden Reagenzien, wie Kaliumnitrat und Aluminiumchlorid.<sup>102</sup>

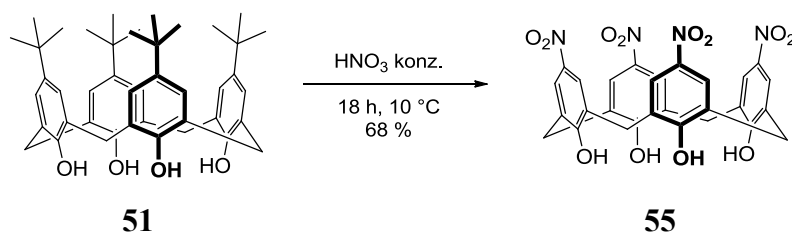


Abb. 4-7 Darstellung des 5,11,17,23-Tetranitrocalix[4]arens **55**.

Entsprechend wurde hier eine *ipso*-Nitrierung des *p*-*tert*-Butylcalix[4]arens **53** in konzentrierter Salpetersäure bei 10 °C erfolgreich durchgeführt.<sup>102</sup> Die Ausbeute von 68 %

und die Analytik des Produkts entsprachen den Literaturangaben. Das  $^1\text{H}$ -NMR zeigt das Verschwinden der *p*-*tert*-Butylprotonen, jedoch einen auch einen sehr geringen Anteil eines weiteren aromatischen Protons, welches auf weitere Konformere schließen lässt, jedoch nicht im Detail analysiert wurde. Massenspektrometrisch wurde ausschließlich das erwünschte Produkt detektiert. Mit dieser Syntheseroute kann die Nitroverbindung auf direktem Wege hergestellt werden. Die Löslichkeit des Tetranitrocalix[4]arens **55** ist sehr schlecht und eine Reinigung war dadurch erschwert. Laut NMR sollte die Verbindung jedoch rein genug für die darauffolgende Reduktion sein und mit dem angestrebten Amin auch eine chromatographische Reinigung möglich werden. Dazu wurde zunächst eine Hydrierung mit Palladium unter Standardbedingungen auf Aktivkohle in Methanol bei Raumtemperatur durchgeführt. Hier bestand jedoch das Problem, dass sich das Edukt nicht vollständig in Methanol lösen ließ. Massenanalytisch konnten nach einer Reinigung nur die Zwischenprodukte, wobei hier jeweils nur eine, zwei oder drei Nitrogruppen reduziert vorlagen, nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der Temperatur unter Einsatz von Ethanol und eine Verlängerung der Reaktionszeit führten ebenfalls nicht zur vollständigen Reduktion. Eine Verbesserung erbrachte der Einsatz von 10 %iger Essigsäure, wodurch schließlich das Produkt detektiert werden konnte. Dennoch waren auch nach sehr langer Reaktionszeit immer noch Zwischenprodukte nachweisbar. Die Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatographie, ESI-MS und nach Abreaktion des Edukts auch mittels HPLC verfolgt. Der Einsatz eines anderen Reduktionsmittels,  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , lieferte zwar das Produkt, jedoch fanden hier Nebenreaktionen statt, welche zu einer großen Anzahl von Nebenprodukten führten.<sup>103</sup> In der Literatur findet man nahezu quantitative Reduktionen von Nitrocalixarenen vor allem mit veretherten Derivaten. Alle verwendeten Methoden erforderten sehr lange Reaktionszeiten und erbrachten neben dem gewünschten vierfach reduzierten Produkt stets auch die einzelnen Zwischenprodukte. Deshalb wurde für die Reaktion der Ansatz unter Einsatz der Mikrowellentechnologie durchgeführt, da dieses Verfahren Reaktionen beschleunigen kann. Die Nitroverbindung wurde in Ethanol mit der äquivalenten Menge an Trifluoressigsäure und Palladium auf Aktivkohle als Katalysator in der Mikrowelle bei 15 W und 70 °C unter Einleitung von Wasserstoff erfolgreich reduziert. Die Reaktion wurde so lange durchgeführt bis MS-Analysen ausschließlich das gewünschte Produkt und keine weiteren Zwischenprodukte mehr anzeigten. Trotzdem gelang mit einer Aufarbeitung über eine MPLC eine Ausbeute von lediglich 37 %. Bei dem isolierten Produkt handelt es sich um genau das Konformer, welches das Singulett für die aromatischen Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR zeigt. Im Rohprodukt sich weitere Konformere, Protonierungsstufen

oder Komplexe mit Lösemittelmolekülen enthalten. Denkbar ist auch die Bildung stabiler Aggregate, worauf eine Dimerbildung im Massenspektrum von **56** hinweist.

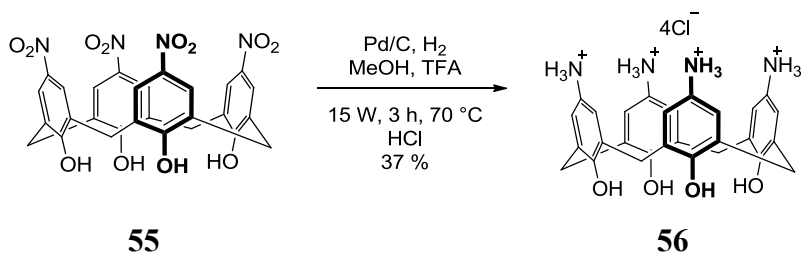


Abb. 4-8 Darstellung des 5,11,17,23-Tetraaminocalix[4]arens **56** durch Reduktion von 5,11,17,23-Tetranitrocalix[4]arens **55**.

Im Folgenden sollte das Tetraamin **56** mit GCP **48** gekuppelt werden. Im Vergleich zu aliphatischen Aminen ist die Kupplung von aromatischen Aminen aufgrund von mesomeren Effekten erschwert. Als Kupplungsreagenz wurde deshalb zunächst 6-Cl-HOBt mit DIC in DMF bei Raumtemperatur eingesetzt, welches zu besonders reaktiven Aktivestern führt. Es konnte jedoch laut NMR und ESI-MS kein Produkt detektiert werden. Auch der Einsatz weiterer Kupplungsreagenzien, Oxalylchlorid oder Chlorameisensäureisobutylester führte nicht zum gewünschten Produkt **57**.

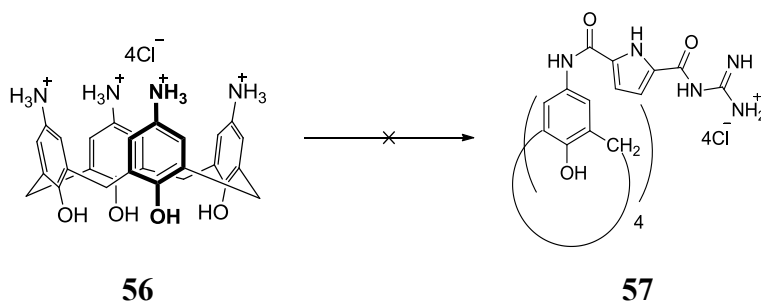


Abb. 4-9 Geplante Synthese zum Zielsystem **57**.

Als Ursache dafür wurden entweder das wenig reaktive aromatische Amin oder sterische Schwierigkeiten vermutet. Um dies zu prüfen, wurde Cbz-β-Alanin **59**, welches eine geringere sterische Hinderung aufweist, unter Einsatz von Chlorameisensäureisobutylester mit **56** gekuppelt (Abb. 4-10). Die Kupplung am *upper rim* war diesmal erfolgreich, jedoch wurde der Cbz-β-Alanin auch zweifach am *lower rim* gekuppelt, was massenspektrometrisch festgestellt werden konnte (siehe Abb. 4-11). Die Ausbeute dieser Verbindung **60** betrug 24 %. Der Rest bestand aus komplexeren Mischungen aus nichtidentifizierbaren Reaktionsprodukten.

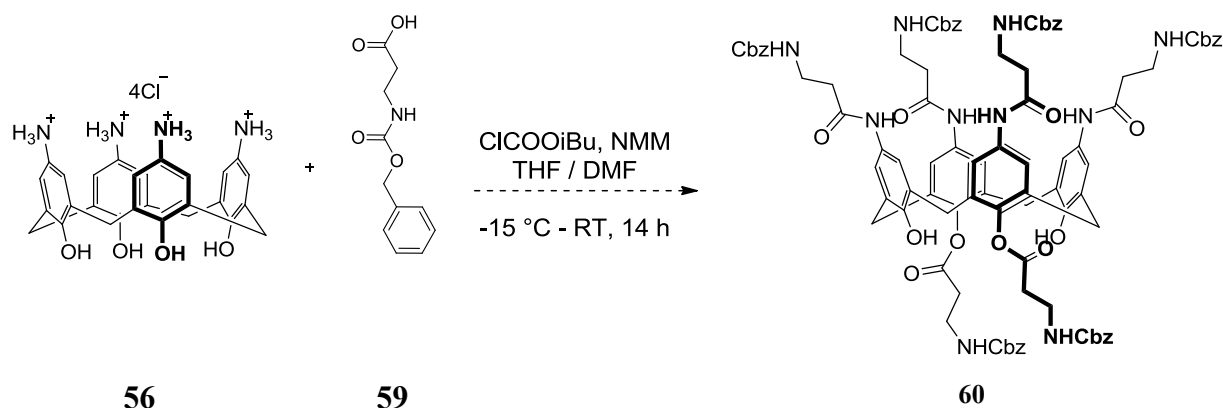


Abb. 4-10 Testreaktion für die Kupplung von **56** mit **59**. Statt des gewünschten vierfach funktionalisierten Produkts wurde die Verbindung **60** durch ESI-MS nachgewiesen.

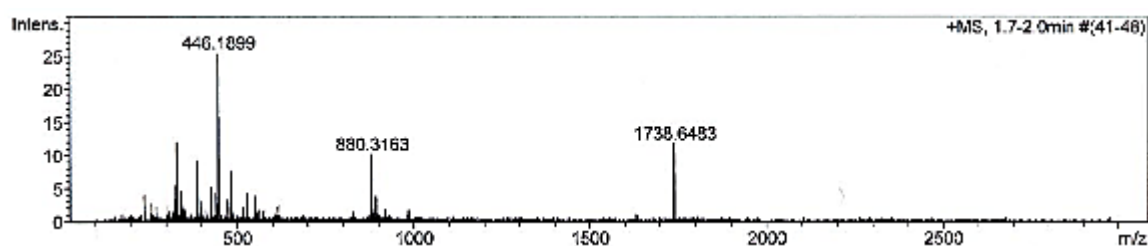


Abb. 4-11 Massenspektrum der Testkupplung mit Verbindung **60** als Hauptprodukt berechnet für  $[C_{94}H_{94}N_{10}NaO_{22}]^+$ : 1737.6436,  $[C_{94}H_{94}N_{10}Na_2O_{22}]^{2+}$ : 880.3164.

Das zeigte, dass das Problem an den sterisch schwierigen Bedingungen für vier GCP-Liganden zu liegen scheint und nicht an den aromatischen Aminen. Es wurde deshalb die Einführung eines Linkers in Betracht gezogen. Weitere Vorteile eines Linkers wären zudem eine erhöhte Flexibilität der Rezeptorarme, was eine präzisere Ausrichtung dieser in Bezug auf das Targetmolekül bedeuten würde. Zur späteren Erkennung von Proteinoberflächen würde damit auch die Spannweite des Rezeptors vergrößert. Im folgenden Abschnitt wird daher die Vorgehensweise zur Einführung eines Linkers zur Darstellung von Verbindung **65** vorgestellt.

Zur Erleichterung der Kupplung wurde ein kurzer Alkyllinker gewählt. Hierzu findet man in der Literatur Syntheserouten für die Bildung des Tetra(2-aminoethyl)-calix[4]arens **63**.<sup>104</sup> Ein Ethyllinker sollte die notwendige Flexibilität erlauben, um eine Kupplung mit dem Guanidincarboxylpyrrol ohne sterische Schwierigkeiten zu ermöglichen. Gleichzeitig ist er noch kurz genug, um die angestrebte konische Kavität beizubehalten. Zur Bildung der Zielstruktur **65** wurde der in Abb. 4-12 dargestellte Syntheseweg gewählt. Nach Bildung des *p*-tert-Butylcalix[4]arens **53** sollte dieses dealkyliert werden, um eine Mannich-Reaktion zum Tetra(dimethylamino-methyl)-calix[4]aren **61** zu ermöglichen. Zur Verlängerung zum Ethyllinker wurde zunächst eine Nitrilgruppe eingeführt und diese weiter zum Amin **63**

reduziert. Mit diesem Alkylamin **63** sollte die Kupplung mit GCP **48** an das Calixaren-Grundgerüst ermöglicht werden.

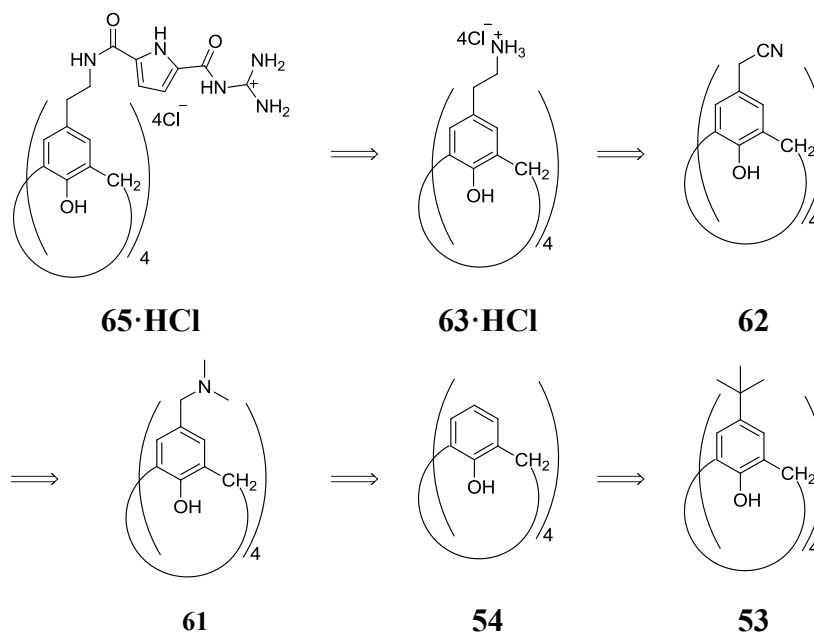


Abb. 4-12 Retrosynthetische Analyse der Synthese von **65·HCl**.

Zur Darstellung des Calix[4]arens **54** wurde das *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren **53** via einer umgekehrten *Friedel-Crafts*-Reaktion dealkyliert. Dazu wurde Aluminiumchlorid als *Lewis*-Säure und Phenol als Abfangreagenz für die *tert*-Butylgruppe in Toluol eingesetzt. Diese Reaktion wurde bereits 1975 von *Tashiro et al.*<sup>105</sup> an Phenolen angewendet und verlief auch in dieser Arbeit für das Calix[4]aren **54** bei Raumtemperatur problemlos mit Ausbeuten von 70 %.<sup>106</sup> Die Reaktion wurde auch bei größeren Ansätzen bis zu 20 g erfolgreich durchgeführt.

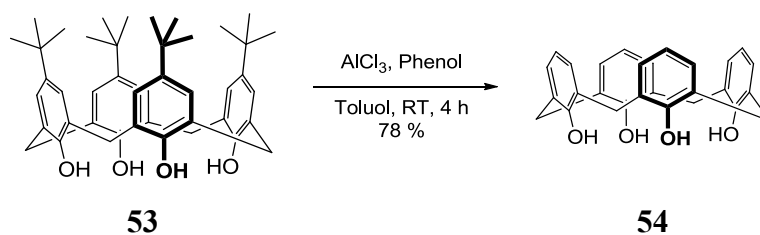


Abb. 4-13 De-Alkylierung von *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren (**53**) zur Darstellung von Calix[4]aren (**54**).

Dieses Calix[4]aren **54** bildet mit Formaldehyd und sekundären Aminen *Mannich*-Basen, welche in die korrespondierenden quartären Salze umgesetzt werden und mit einem weiteren Nucleophil reagieren können. Dies wurde hier zur Verlängerung des Linkers genutzt.

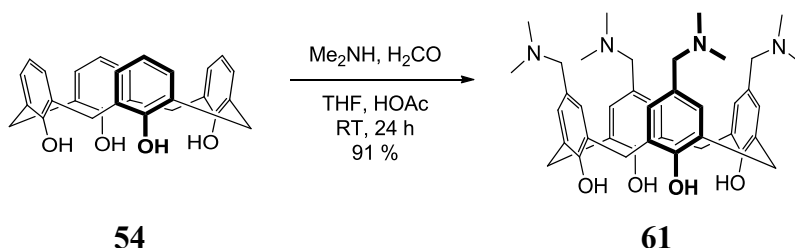


Abb. 4-14 Mannich-Reaktion zur Synthese von **61**.

Die *Mannich*-Reaktion konnte entsprechend der Literatur unter Einsatz von Dimethylamin und Formaldehyd in Tetrahydrofuran mit Essigsäure in sehr guten Ausbeuten von 91 % durchgeführt werden.<sup>104</sup> In einem weiteren Schritt wurde **61** unter Zugabe von Methyljodid weiter zum quartären Ammoniumsalz umgesetzt. Als Nucleophil diente dann Natriumcyanid, welches über eine *p*-Quinonmethid-Reaktion zur Bildung des Cyanomethylcalix[4]arens **62** in Ausbeuten von 70 % führte.

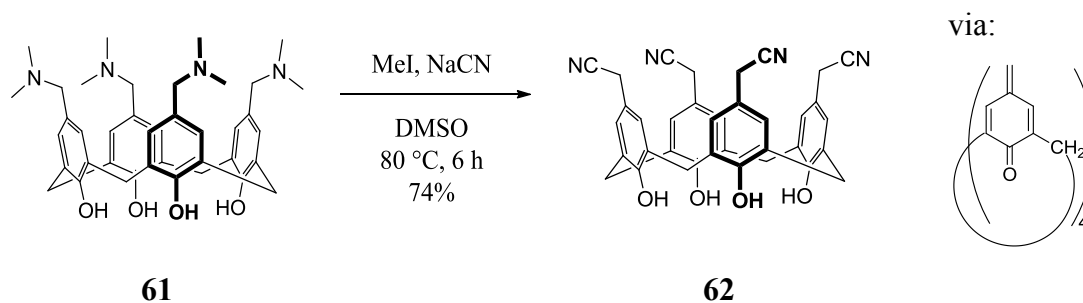


Abb. 4-15 Synthese des Tetra(cyanomethyl)-calix[4]arens **62** über ein Quinonmethid.

Abweichend von den Literaturangaben wurde zur Aufarbeitung nicht mit Salzsäure angesäuert, sondern stattdessen sehr gut mit Wasser gewaschen, um restliches Natriumcyanid zu entfernen. Dadurch werden aber nicht alle Hydroxylgruppen protoniert, was zur Folge hat, dass die *cone*-Konformation, wie man in Abb. 4-16 unten sieht, ausgebildet wird. Darauf deutet auch die erhebliche Tieffeldverschiebung der Hydroxylprotonen hin. Im Gegensatz dazu lieferte ein Ansatz unter Zugabe von Säure eine *1,3-alternate*-Konformation, was man an einem Singulett für die Methylenprotonen erkennt (Abb. 4-16 oben). Für die Folgereaktion gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied.



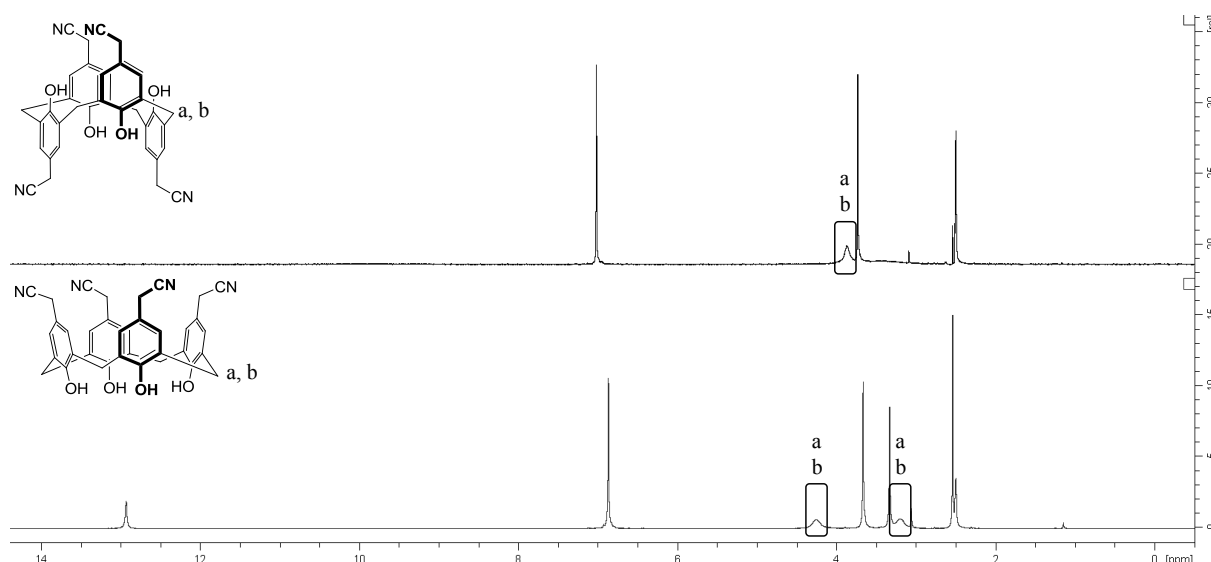


Abb. 4-16 oben: Synthese mit anschließendem Ansäuern führt zu einer 1,3-alternate-Konformation; unten: Synthese ohne anschließendem Ansäuern führt zu einer cone-Konformation.

Das frisch isolierte Produkt liegt zunächst farblos vor und färbt sich über mehrere Tage gelblich. Eine Umsetzung oder Zersetzung konnte mittels  $^1\text{H}$ -NMR ausgeschlossen werden. Die anschließende Reduktion des Nitrils **62** mit einer 1M Boran-Tetrahydrofuran-Komplex-Lösung in Tetrahydrofuran gelang in Anlehnung an die Literatur in guten Ausbeuten.<sup>104</sup> Es wurde das Hydrochlorid des Amins **63** isoliert. Erst durch eine Aufnahme des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums in deuteriertem Wasser wurden THF-Einschlüsse im Molekül sichtbar. Diese ließen sich weder durch Trocknung unter Vakuum noch durch Reinigung mit Diethylether, noch durch Gefriertrocknung entfernen.

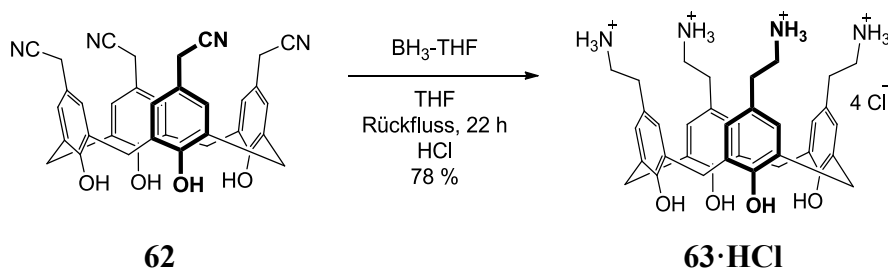


Abb. 4-17 Reduktion des 5,11,17,23-Tetra(cyanomethyl)-calix[4]arens **62** zum 5,11,17,23-Tetra(2-aminoethyl)-calix[4]aren-hydrochlorid **63·HCl**.

Eine Umkristallisation entsprechend der Literatur führte zu einem sehr feinen Niederschlag, welcher nur schwer zu isolieren war. Diese Problematik konnte umgangen werden, indem eine säulenchromatographische Reinigung an der MPLC durchgeführt wurde, welche zudem einen hohen Reinheitsgrad von 92 % erzielte.

Mit der erfolgreichen Synthese des Tetra(2-aminoethyl)-hydrochlorids **63·HCl** stand nun das Gerüst für die Kupplung mit den Pyrrolbausteinen zur Verfügung. Zur Kupplung des Calix[4]arens mit dem Pyrrolbaustein wurden verschiedene Kupplungsreagenzien zur

Aktivierung der Carbonsäure eingesetzt. Ansätze mit Isobutylchlorformiat, Cl-HOBt/DIC, Thionylchlorid oder auch PyBOP führten aber nicht zu einer erfolgreichen Isolierung des Produkts. Ein geringer Umsatz konnte jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, da sich die analytische Kontrolle dieser Reaktion im Nachhinein als nicht ganz trivial erwies. Der Grund für die Schwierigkeiten bei der Analytik des Produkts lag darin, dass verunreinigte und dazu konformativ frei bewegliche Calixarene im NMR sehr schwer zu identifizieren sind und diese Verbindung über ESI-MS-Experimente auch nur in sehr hohen Reinheitsgraden oder nach Entschützung der Boc-Schutzgruppe detektierbar wurde.

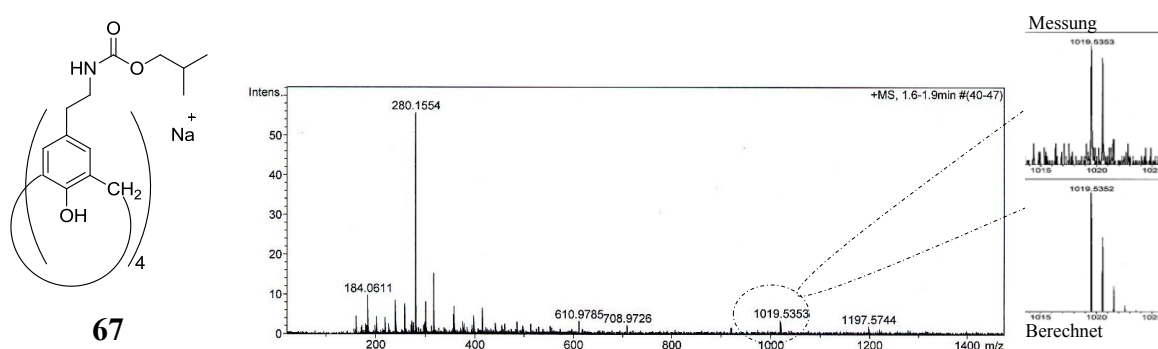


Abb. 4-18 Analytik der Kupplung mit Hilfe von Isobutylchlorformiat zeigte als Nebenprodukt das Isobutylcarbamat des Calixarens **67** mit pos. ESI-ToF:  $m/z = 1019.5348 [M + Na]^+$ ; berechnet für:  $[C_{56}H_{76}N_4NaO_{12}]^+ : 1019.5352$ .

Zum Beispiel führte ein Ansatz, welcher mit Isobutylchlorformiat in Dichlormethan durchgeführt wurde, zu Nebenprodukten wie dem Isobutylcarbamat des Calixarens **67** und einem unidentifizierbaren Polymer. Diese Nebenprodukte konnten sowohl mittels ESI-MS als auch im  $^1H$ -NMR detektiert werden. Der Einsatz von Thionylchlorid führte dagegen zu einer Zersetzung der Edukte.

Die erste erfolgreiche Detektion des Zielmoleküls gelang mit einer Kupplung unter separater Darstellung des Aktivesters. Dazu wurde der Succinimidester **50** der Carbonsäure **48** mit EDC·HCl in Dimethylformamid nahezu quantitativ hergestellt. Hierbei führte der Ansatz bei 0 °C im Vergleich zu einem entsprechenden Ansatz bei Raumtemperatur zu einer Verbesserung der Reinheit des Produktes.

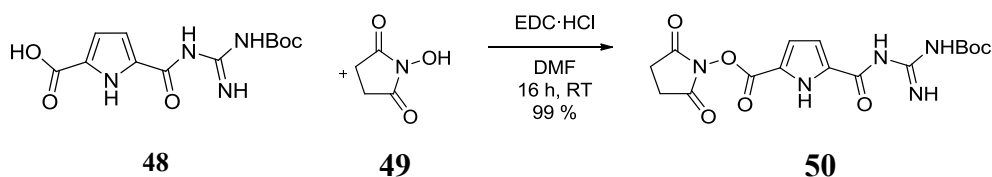


Abb. 4-19 Darstellung des  $^1H$ -Pyrrol-5-(N-boc-guanidinocarbonyl)-2-hydroxysuccinimidesters **50**.

Zur Darstellung des Zielmoleküls **65** wurde das Tetra(2-aminoethyl)-Hydrochlorid **63·HCl** in Dimethylformamid, *N*-Methylmorpholin als Base und der Succinimidester **50** bei 0 °C zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel gereinigt und das Produkt **64** isoliert. Die Zuordnungen im NMR-Spektrum sind jedoch nicht deutlich zu bestimmen, da die Signale sehr stark verbreitert sind. Eine Aussage über eine vollständige Funktionalisierung aller vier Positionen oder über die Konformation konnte nicht getroffen werden (siehe Abb. 4-21).

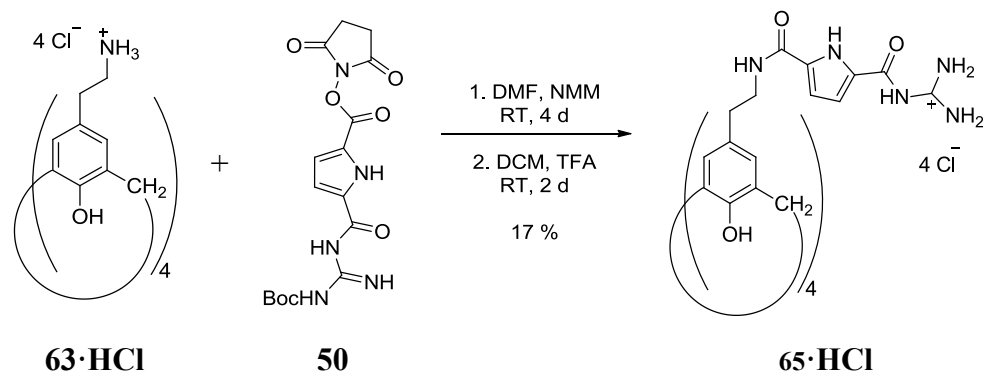


Abb. 4-20 Kupplung und anschließende Entschützung zum 5,11,17,23-Tetrakis(1*H*-Pyrrol-5-(Guanidiniocarbonyl)-2-Amidoethyl)-Calix[4]aren-Hydrochlorid **65·HCl**.

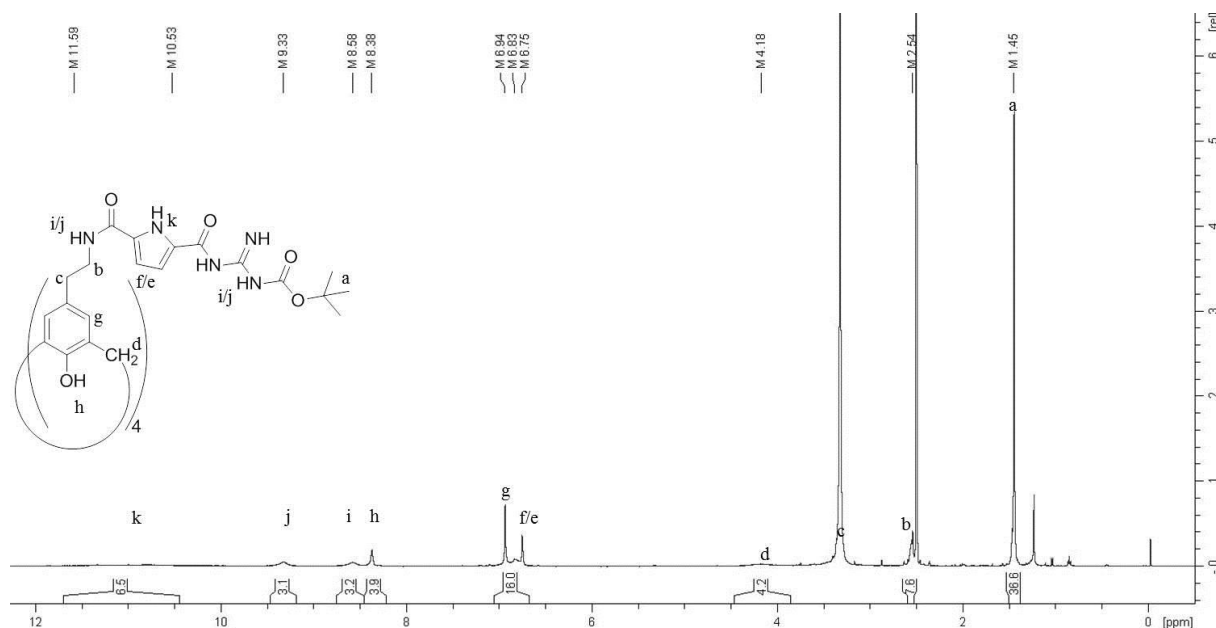


Abb. 4-21 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum der Verbindung **64** in  $\text{DMSO}-d_6$  bei 25 °C.

Deshalb wurde das erhaltene Rohprodukt direkt in Dichlormethan und Trifluoressigsäure entschützt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch mittels MPLC und präparativer HPLC gereinigt und das TFA-Salz unter Einsatz der Gefriertrocknungsanlage zum Chloridsalz umgesalzen. Insgesamt wurde hier eine Ausbeute von 17 % erreicht, was auf den Anspruch einer sehr hohen Reinheit zurückzuführen ist. Diese betrug laut HPLC unter

isokratischen Laufbedingungen 94 % bei einer Betrachtung bei 290 nm (siehe Abb. 4-22). Eine Kupplung über die freien Hydroxylgruppen ließ sich mit Hilfe eines COSY90-Spektrums ausschließen. Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des erfolgreich synthetisierten und isolierten Produkts **65** ist bei einer Aufnahme bei Raumtemperatur nicht genau zu analysieren. In Abb. 4-22 sieht man, dass die Resonanz der Methylenprotonen (d) als Paar von Dubletts nur zu erahnen ist. Zudem wird die Auswertung durch ein überlagerndes Wassersignal erschwert.

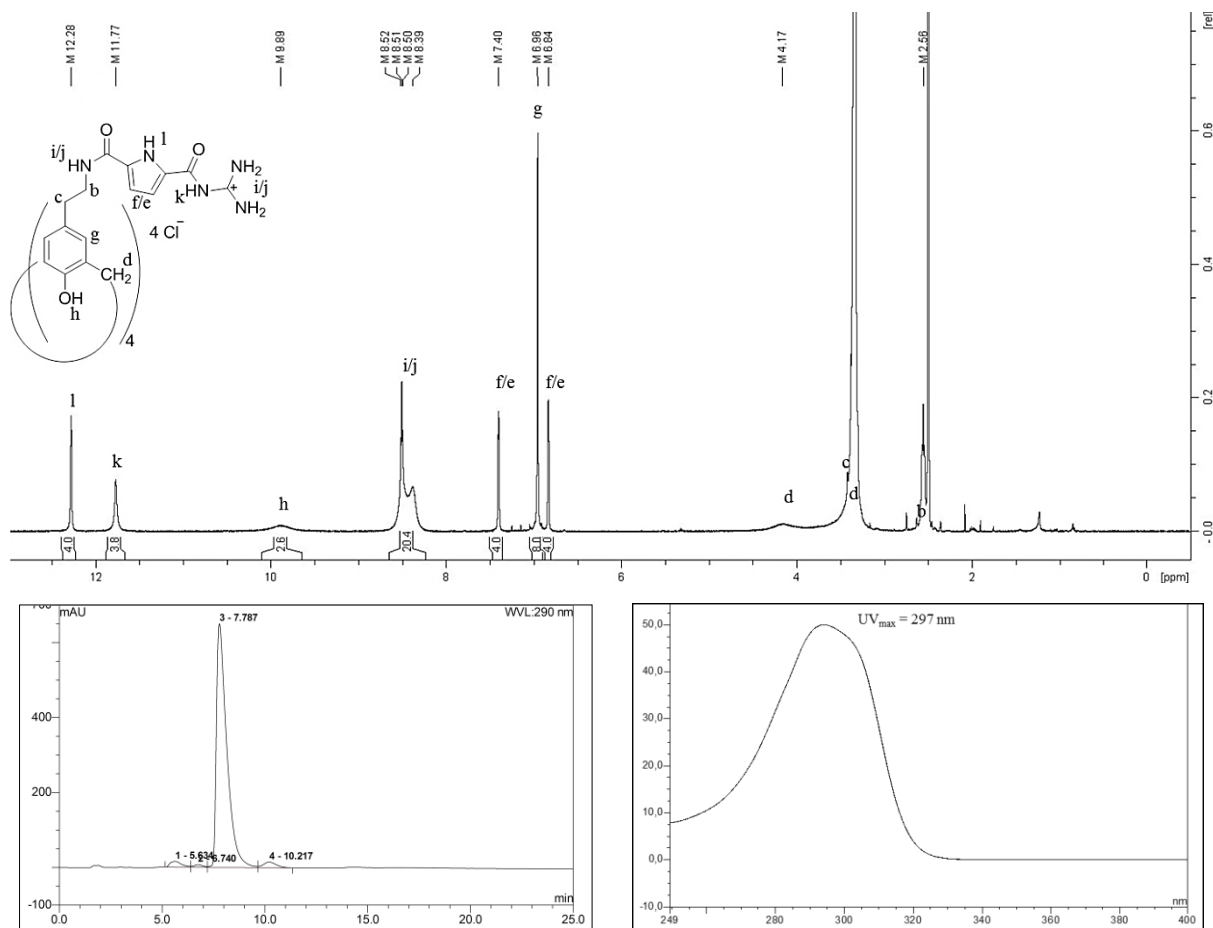


Abb. 4-22 Oben: 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Produkts **65** in  $\text{DMSO}-d_6$  bei 25 °C. Unten: HPLC-Lauf:  $r_t = 7.79$  min (Isokratisch: 66 % MeOH + 0.05 % TFA, , 94 % Reinheit bei 290 nm) mit UV-Spektrum des Produkts.

Eine Erleichterung der Interpretation erbrachte eine Messung bei höheren Temperaturen (siehe Abb. 4-23). Hierdurch konnte eine stattfindende Inversion beschleunigt und damit die Auflösung der Signale erhöht werden. Außerdem hatte dies den Nebeneffekt, dass das Wassersignal verschoben und damit bisher verdeckte Signale frei gelegt wurden. *Kämmerer et al.*<sup>107</sup> zeigten als Erste, dass auf Grund der konformativen Flexibilität des Moleküls bei 60 °C das Paar aus Dubletts zu einem scharfen Singulett wird. Er interpretierte dies als das Vorliegen der *cone*-Konformation. Das konnte auch für **65** durch eine temperaturabhängige Messung nachgewiesen werden. Und auch das gemessene  $^{13}\text{C}$ -Signal für die

Methylenprotonen bei 31.4 ppm entspricht der „*de Mendoza rule*“ für eine *syn*-Stellung der Aromaten zueinander. Diese wurde erstmals 1991 aufgestellt und besagt, dass die Resonanzverschiebung der Methylenkohlenstoffe direkt auf die Konformation des Calixarens hinweist. Danach liegt sie bei etwa 31 ppm bei einer *syn*-Orientierung der benachbarten Arylgruppen und bei etwa 37 ppm bei der *anti*-Stellung.<sup>108</sup>

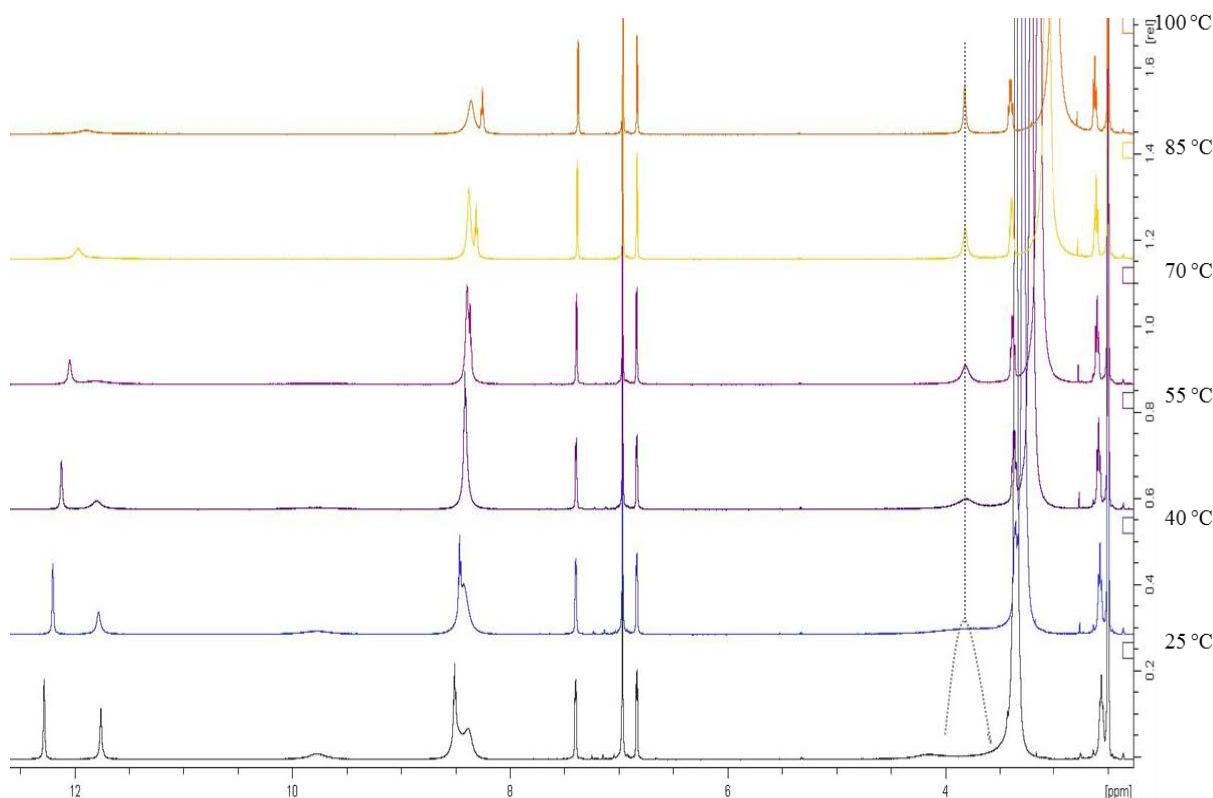


Abb. 4-23 Temperaturabhängiges  $^1\text{H}$ -NMR bei 25 °C, 40 °C, 55 °C, 70 °C, 85 °C und 100 °C.

Damit konnte bestätigt werden, dass das Produkt **65** bei Raumtemperatur in der *cone*-Konformation vorliegt, auch wenn diese relativ beweglich ist. Diese Interpretation sollte durch theoretische Berechnung gestützt werden.

Zur Veranschaulichungen der Anordnung der Pyrrolliganden am Calixaren-Grundgerüst wurden Kraftfeldrechnungen mit MacroModel von *Schrödinger* durchgeführt. Hier wurde so vorgegangen, dass zunächst eine Minimisierung durchgeführt und mit dieser Struktur eine Konformationsanalyse mit 10000 Zyklen berechnet wurde. Als Kraftfeld diente OPLS\_2005\* mit Wasser als Kontinuum-Lösemittel. Das Minimum der Berechnung von **65** ist in Abb. 4-24 mit den gebildeten Wasserstoffbrücken abgebildet.

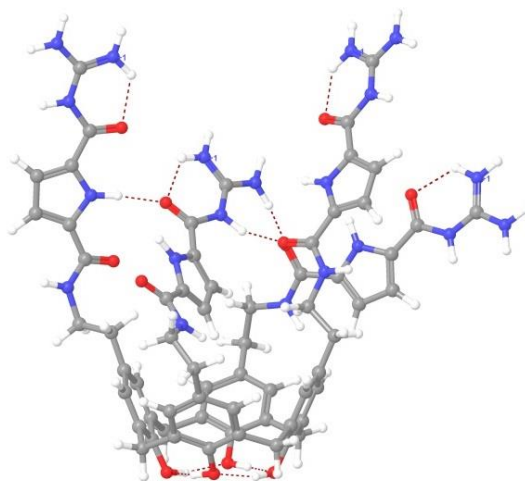


Abb. 4-24 Ergebnis der Konformationsanalyse von **65** mit OPLS\_2005\* mit Wasser als Kontinuumlösemittel.

Hier zeigt sich, in welchem Maße die *cone*-Konformation durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxygruppen auch in Wasser stabilisiert wird. Durch diese räumliche Fixierung werden auch die Substituenten am *upper rim* trotz möglicher Abstoßung durch die positiv geladenen Guanidiniogruppen zusammengehalten. Dadurch können auch zwischen den einzelnen Liganden Wechselwirkungen zueinander ausgeübt werden. Dieses Minimum zeigt, dass sich ein Ligand über die Kavität des Calixarens neigt und auf diese Weise je eine Wasserstoffbrückenbindung mit den anderen drei Liganden ausbildet.

Mit dem Tetrakis(GCP)-Calixaren **65·HCl** wurde eine Struktur synthetisiert, die in Bezug auf ihre Flexibilität abhängig von der Stabilität der Wasserstoffbrücken und damit vom Lösemittel ist. Trotzdem weist sie laut NMR auch in DMSO die *cone*-Konformation auf. Die finale Kupplung konnte nur in geringen Ausbeuten durchgeführt werden, was vermutlich an den konkurrierenden Hydroxygruppen und einer nicht fixierten Konformation des Edukts lag. Jedoch konnte durch eine Reinigung mittels präparativer HPLC ein sehr hoher Reinheitsgrad erzielt werden, welcher v. a. für die Messungen mit Biomolekülen entscheidend ist.

Die beiden vorgestellten Synthesewege haben gezeigt, wie ein GCP-Baustein an einem Calixaren-Grundgerüst angebracht werden kann. Schwierigkeiten und geringe Ausbeuten bei einigen Zwischenstufen waren auf die freien Hydroxygruppen und die Flexibilität des Calixarens zurückzuführen. Um hier eine Verbesserung zu erreichen, kann man das Calixaren an seinem *lower rim* funktionalisieren (siehe Kap. 4.2).

Nach der erfolgreichen Synthese der Verbindung **65** sollte diese auf ihre Eigenschaften bezüglich der Erkennung von verschiedenen kleineren anionischen Substraten wie Aminosäuren, Nucleotiden und verschiedenen anderen Oxo-Anionen untersucht werden. Um diese Bindungsstudien durchführen zu können, wurden zunächst die physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Löslichkeit, Absorptionsverhalten und der  $pK_s$ -Wert von Verbindung **65** bestimmt.

#### 4.1.2 Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Rezeptors **65**

Im folgenden Abschnitt werden die Eigenschaften des multivalenten Rezeptors **65** vorgestellt, welche für anschließende Bindungsstudien mittels UV-Spektroskopie berücksichtigt werden müssen. Zunächst wird die Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes beschrieben und danach Versuche zur Selbstaggregation durchgeführt.

Da die Bindungsstudien unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt werden sollten, wurde zunächst die Löslichkeit von **65** in Wasser geprüft. Trotz polarer Liganden erweist sich der Rezeptor **65** aber als nicht vollständig wasserlöslich. Die Stammlösungen für die anschließenden Messungen wurden deshalb jeweils in DMSO angesetzt, in welchem eine maximale Konzentration von 10 mM erreicht werden kann. Eine Lagerung im Kühlschrank führt jedoch zu gelartigen winzigen Klümpchen, welche durch Behandlung im Ultraschallbad aufgelöst werden können. Deshalb wurden meist 1.0 mM Stammlösungen eingesetzt und diese entsprechend verdünnt.

Die Verbindung **65** zeigt in wässriger Lösung eine UV-Absorptionsbande im Bereich von 300 nm, welche typisch für Pyrrol ist. Damit hat man eine ideale Messsonde zur Bestimmung der Bindungseigenschaften gegeben. Die meisten der untersuchten Substrate absorbiert nicht in diesem Bereich, weshalb für die Substrate kein  $\epsilon$ -Wert bestimmt werden musste. Die  $\epsilon$ -Werte von **65** sind stark abhängig von der Lösemittelzusammensetzung und dem pH-Wert, was bei einer Bestimmung des  $pK_s$ -Wertes deutlich wird.

Der  $pK_s$ -Wert des Calix[4]arens **65** wurde anhand einer pH-Titration unter Aufnahme der UV/Vis-Spektren und anschließender Auswertung mithilfe des Programms *Specfit* von *Spectrum Software Associates* bestimmt.<sup>109</sup> Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit wurde eine 1.0 mM Stammlösung in DMSO hergestellt, welche mit Wasser auf eine Konzentration von 0.01 mM gebracht wurde. Eine Löslichkeit war somit gegeben und mit einem DMSO-Anteil von lediglich 1 % kann dessen Einfluss auf die  $pK_s$ -Bestimmung vernachlässigt werden. Vor Beginn der Titration wurde die Probe mit 0.1 M HCl versetzt, um

sicherzustellen, dass das Molekül vollständig protoniert vorliegt. Die Titration wurde mit NaOH als Base durchgeführt und erst beendet, wenn der pH-Wert deutlich im Basischen lag und sich trotz weiterer Zugabe an NaOH kaum änderte. Dabei stellte das Hydroxycalixaren **65** eine besondere Herausforderung dar, weil das Calix[4]aren neben seiner Multivalenz auch in verschiedenen Deprotonierungsgraden vorliegen kann, welche durch intramolekulare Wechselwirkungen oder Lösemittleffekte unterschiedlich stabilisiert werden (siehe Abb. 4-25).

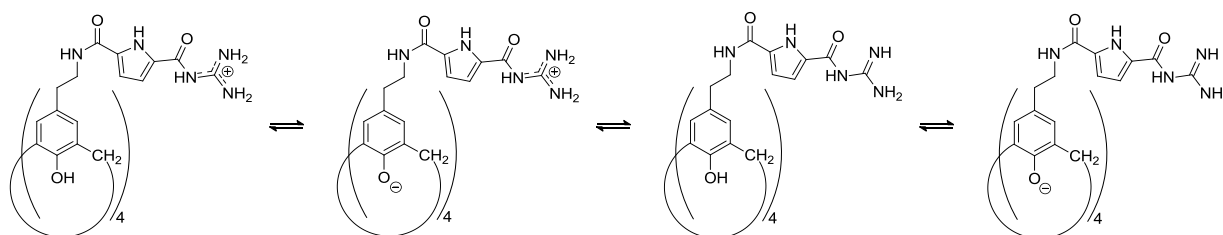


Abb. 4-25 Die verschiedenen Deprotonierungsgrade des multivalenten Hydroxycalix[4]arens **65**.

Wie zu erwarten für eine schwache Säure, erfolgt durch eine Titration mit NaOH als starke Base ein deutlicher pH-Sprung bei etwa pH 6. Dabei ist anzunehmen, dass man hier alle vier Deprotonierungen der Guanidinio-Gruppen gemittelt detektiert (siehe Abb. 4-26).

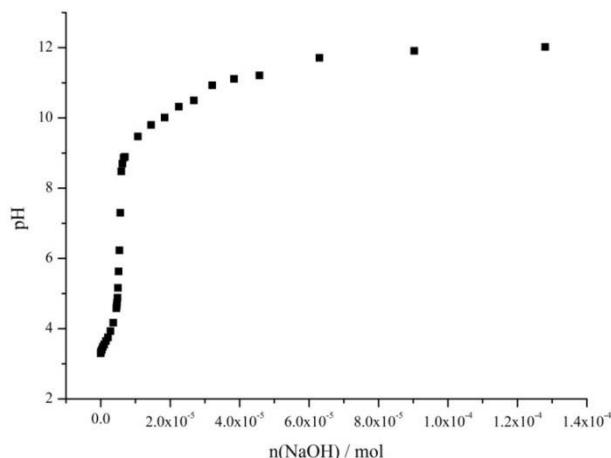


Abb. 4-26 Titrationskurve des Hydroxycalix[4]arens **65** mit NaOH. Aufgetragen ist der gemessene pH-Wert in Abhängigkeit von der Stoffmenge der zugegebenen Natronlauge in mol.

Im alkalischen Bereich kann man einen zweiten sehr geringen pH-Sprung erahnen, welcher der OH-Gruppe als sehr schwache Säure zuzuordnen ist. Jedoch ist hier nicht ganz klar, ob es sich ebenfalls um einen gemittelten  $pK_s$ -Wert für die vier Hydroxygruppen handelt. Hierzu haben *Reinhoudt et al.* grundlegende Untersuchungen an Sulfuryl- und Nitrocalixarenen unternommen und konnten sowohl durch photo- und potentiometrische Titrations als auch durch semiempirische Rechnungen (AM1) Folgendes belegen. Für eine Deprotonierung der ersten Hydroxylgruppe  $pK_{s1}(OH)$  wurde ein  $pK_s$  von 1-3 bestimmt und dieses Verhalten als



“*super acidic*” bezeichnet. Die Ursache dafür wurde durch eine optimale Stabilisierung des Anions im Vergleich zur undissoziierten Spezies angegeben. Der  $pK_{s2}(OH)$  liegt bei den genannten Systemen bei ca. 10, was sogar geringfügig größer ist, als bei den vergleichbaren acyclischen Systemen. Dies wird dadurch erklärt, dass bei der Bildung eines Dianions zwar ebenso Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können, jedoch elektrostatische Abstoßungen dazu kommen. Der Wert für  $pK_{s4}(OH)$  soll sogar oberhalb von 14 liegen und ist damit in Wasser nicht mehr messbar sein. Diese Untersuchungen wurden in Anlehnung an enzymatische Systeme durchgeführt, welche ebenso Wasserstoffbrückenbindungen induzierte  $pK_a$ -Verschiebungen aufzeigen, z. B. die Oxo-Anionentasche, ein tetraedrischer Übergangszustand während der Proteolyse der Serinprotease.<sup>110</sup>

Betrachtet man die gemessenen UV/Vis-Spektren, nimmt die Absorption mit zunehmendem pH zunächst ab, bis der  $pK_s$ -Wert erreicht wird. Zwischen pH 5.16 und pH 7.30 findet eine bathochrome Verschiebung um 9 nm statt. Zwischen pH 8.48 und 8.89 bleibt die Absorption konstant, was darauf hinweist, dass alle Guanidiniogruppen deprotoniert vorliegen. Ab einem pH-Wert von 9.47 nimmt die Absorption zu, bis sie ein Plateau erreicht. In diesem Bereich findet die Deprotonierung der Hydroxygruppen statt, wobei es sich hier vermutlich um zwei bis drei Protonen handelt, weil die erste OH-Gruppe bereits zu Beginn der Titration deprotoniert vorlag und eine vollständige Deprotonierung noch nicht erreicht wurde.

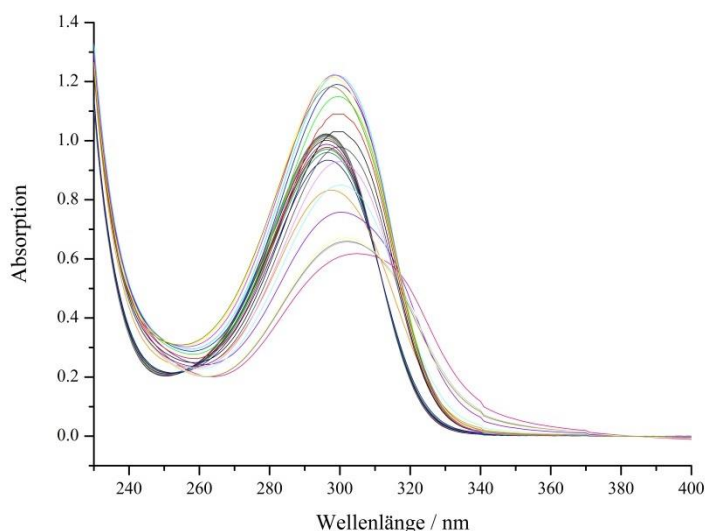


Abb. 4-27 Absorptionsspektren der Verbindung **65** in Wasser/1 % DMSO (0.01 mM) bei Zugabe von NaOH.

Die Absorption der Verbindung **65** ändert sich also sowohl in ihrer Intensität als auch durch eine bathochrome Verschiebung als Funktion des pH-Wertes deutlich. Dies weist auf starke intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der undissoziierten und dissoziierten

Spezies hin. Eine Bestimmung mit *SpecFit* lieferte für **65** einen  $pK_s$ -Wert von  $5.64 \pm 0.011$  für die Guanidinio-Funktion und  $9.92 \pm 0.053$  für die Hydroxyprotonen (siehe Abb. 4-28).

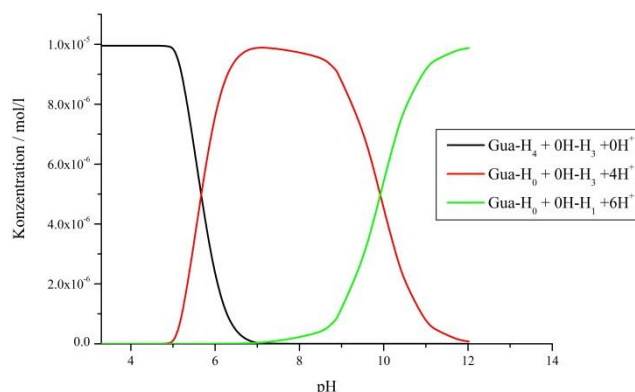


Abb. 4-28 Von *Specfit* ermittelte Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert:  $pK_s(\text{Gua}) = 5.64 \pm 0.11$  und  $pK_s(\text{OH}) = 9.92 \pm 0.053$ . Dabei wurde ein gemittelter  $pK_s$ -Wert der vier Guanidinio-Funktionen und ein  $pK_s$  für zwei Hydroxy-Funktionen angenommen.

Die im Folgenden beschriebenen Bindungsstudien wurden hauptsächlich bei einem pH von 6.0 durchgeführt. Für Proteine wie das untersuchte P97 sind aus Stabilitätsgründen physiologische Bedingungen erforderlich. Deshalb sollten die Testmessungen möglichst auch bei neutralem pH durchgeführt werden. Bei einem pH von 7 ergeben sich jedoch Schwierigkeiten mit der Löslichkeit des Rezeptors, weshalb ein pH von 6 gewählt wurde. Hier sind etwa die Hälfte der Guanidinidino-Funktionen protoniert und erhöhen damit die Löslichkeit. Saurere Bedingungen würden durch die räumliche Nähe der Guanidinium-Funktionen zueinander zu einer Abstoßung und damit zur Auflösung der eingestellten *cone*-Konformation führen.

Außerdem muss eine weitere Eigenschaft der Calixarene berücksichtigt werden. Es ist bekannt, dass bereits nicht funktionalisierte Calixarene ein amphiphiles Verhalten aufweisen.<sup>36</sup> Mit den Hydroxygruppen am *lower rim* hat man eine polare Kopfgruppe gegeben und das Calixaren-Grundgerüst bildet den lipophilen Teil. Diese Eigenschaft kann noch durch Funktionalisierung verstärkt und möglicherweise kontrolliert werden.<sup>111</sup> In wässrigen oder organischen Lösemitteln bilden sich dann Mizellen, bei denen es sich um ungebundene, meist sphärische Aggregate handelt, die spontan von amphiphilen Molekülen beim Überschreiten der kritischen Mizellenbildungskonzentration (KMK) gebildet werden. Um dies zu prüfen, wurden DPH-Messungen durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzassay zur Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration von Amphiphilen.<sup>112</sup>

Das Prinzip beruht darauf, dass die Fluoreszenz des 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriens, DPH **66**, durch seinen Einschluss in das hydrophobe Innere der Mizelle, oberhalb der KMK stark erhöht ist. Eine Lösung des DPH wurde mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in TRIS-Puffer bei pH 6.0 hergestellt. Dabei wurde eine Stammlösung mit DMSO verwendet, da DPH nicht in wässrigen Puffern löslich ist und somit eine genaue Einwaage nicht möglich wäre. Das jeweilige Amphiphil wurde mit variierender Konzentration (1-10  $\mu\text{M}$ ) zugegeben und diese Mischung 12 Stunden mithilfe eines Peptidschüttlers geschwenkt. Zur Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des Amphiphils bei 429 nm aufgetragen (siehe Abb. 4-29).

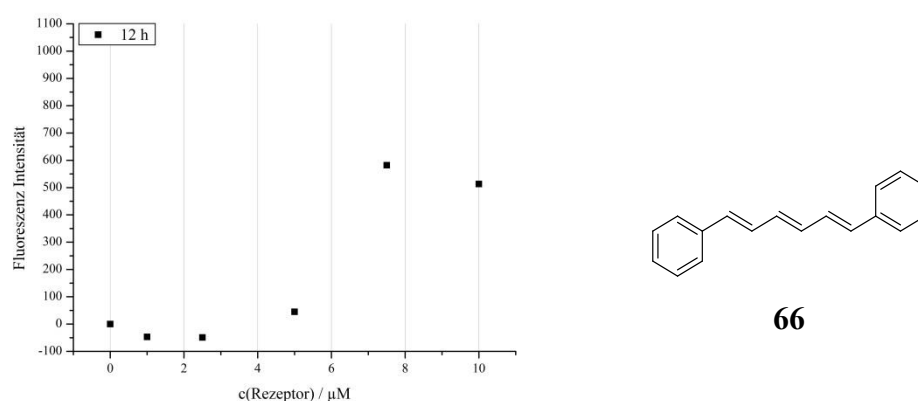
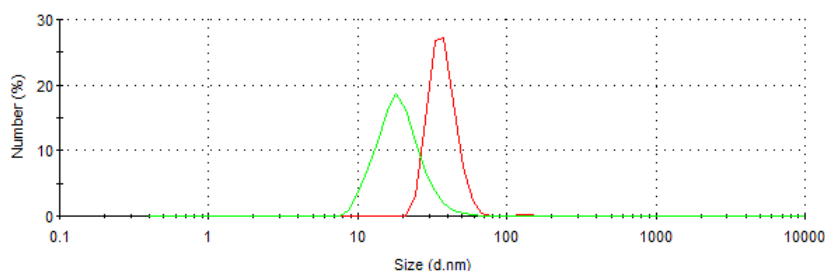


Abb. 4-29 Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration der Verbindung **65** bei 429 nm.

Wie man in der Abbildung sieht, nimmt die Fluoreszenz zwischen 5 und 7.5  $\mu\text{M}$  sprunghaft zu. Diese Messungen erlauben noch keine exakte quantitative Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration, jedoch erhält man erste Hinweise, dass sich für Rezeptor **65** bereits unterhalb von 10  $\mu\text{M}$  mizellenartige Strukturen ausbilden.

Um nun zu prüfen, ob diese Mizellenbildung möglicherweise nur durch das vorliegende unpolare Substrat **66** eintritt oder auch von **65** allein gebildet wird, wurden DLS-Messungen durchgeführt. Die Bedingungen wurden entsprechend den DHP-Messungen und späteren UV-Messungen in TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6, 1 % DMSO) durchgeführt. Vor jeder Messung wurde das eingesetzte Lösemittel filtriert, um es von Staubpartikeln etc. zu befreien. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt und der Mittelwert betrachtet.



	c (65) / $\mu\text{M}$	Volumenstreuverh./ nm (%) , Peakbreite / nm	Anzahlstreuverh./ nm (%) , Peakbreite / nm	Durchschnitt / nm	PDI
Grün	5.0	34.95 (99.4), 22.5 4378 (0.6), 1273	23.2, (100), 7.45	58.2	0.368
Rot	10.0 <sup>a</sup>	240 (43.2), 105 39.1 (51.5), 9.34 5469 (5.7), 633	35.1, (99.2), 7.29 144.3, (0.8), 60.3	225.9	0.441
Lösemittel (nicht dargestellt)	0	456 (96.6), 154 5590 (3.4), 580	15.71, (100), 2.75	421.8	0.338

Abb. 4-30 DLS-Messungen mit 65 in TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6, 1 % DMSO) mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  (grün) und 10  $\mu\text{M}$  (rot). Dargestellt sind die Kurven des Anzahlstreuverhaltens. Die Größe der Strukturen ist über den Durchmesser in nm angegeben. <sup>a</sup> 10 min Ultraschall

Eine DLS-Messung bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war erst nach Behandlung der Probe im Ultraschallbad (10 min) möglich, was einen Hinweis auf eine deutlich polydispersere Zusammensetzung gibt. Ein Vergleich bestätigt dennoch die Ergebnisse der DHP-Messung, dass bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  komplexere Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 35 nm vorliegen als bei 5  $\mu\text{M}$  mit 23 nm.

AFM-Aufnahmen unter denselben Bedingungen jedoch in Wasser statt in Puffer weisen auf die Bildung von Vesikeln hin, was an den Phasenbildern durch den typischen dunklen Kreis mit hellem Rand zu erkennen ist. Das unterschiedliche Verhalten bei verschiedenen Konzentration wird hier auch in der Höhe und Form der gebildeten Aggregate deutlich (siehe Abb. 4-31). Die größeren Aggregate werden bei höherer Konzentration gebildet und vermutlich auch mehr Lösemittel eingeschlossen, was zu einem abgerundeteren Profil führt.

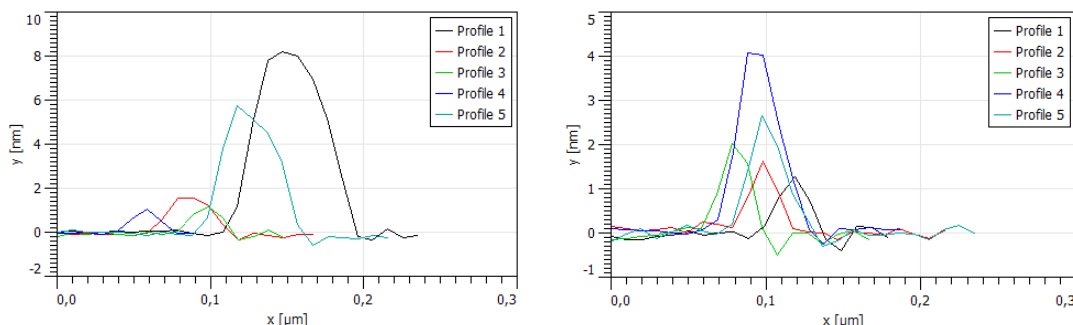


Abb. 4-31 Höhenprofile der AFM-Aufnahmen von 65 in Wasser/1 % DMSO mit 10  $\mu\text{M}$  (links) und 5  $\mu\text{M}$  (rechts).

Aufgrund dieser Informationen wurde eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für die folgenden Bindungsstudien gewählt, bei welcher eine Verdünnung des Rezeptors entsprechend des *Lambert-Beer'schen Gesetzes* proportional zur Absorption ist. In TRIS-Puffer mit 1 % DMSO und einem pH von 6 erhält man für **65** Epsilonwerte von  $92.6 \pm 6.89 \cdot 10^3 \text{ cm}^2 (\text{mmol})^{-1}$  bei einem Absorptionsmaximum von 297 nm.

#### 4.1.3 Bindungsstudien des Rezeptors **65** mit verschiedenen Substraten

Der Rezeptor **65** mit seinen multivalenten GCP-Liganden wurde zur Erkennung von P97 konzipiert. Bei dem Protein P97 sollen die sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure als Bindungsstelle fungieren. Das Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv hat seine Fähigkeit zur Bindung von verschiedenen Oxo-Anionen und als Komponente von peptidischen Rezeptoren für die Erkennung von Enzymen bereits mehrfach unter Beweis gestellt.<sup>4,113–117</sup> Nun soll auch das Potential dieses Rezeptors **65**, welcher sich durch vier GCP-Einheiten auszeichnet, die in eine Richtung orientiert sind und eine gewisse Flexibilität gewähren, untersucht werden. Bevor Bindungsstudien mit P97 durchgeführt wurden, wurden jedoch kleine, physiologisch interessante Moleküle als Substrate für die Verbindung **65** untersucht, um die Bindungsaffinität für die jeweiligen Bindungsstellen besser abschätzen zu können. Zum Einsatz kamen hierbei saure Aminosäuren, Nucleotide und weitere Oxo-Anionen. Erste Bindungsstudien zur Komplexbildung wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie durchgeführt. Dabei wird ausgenutzt, dass durch eine Komplexierung und damit der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Substrat eine Umorientierung der Elektronendichte stattfindet und damit eine Änderung im UV/Vis-Absorptionsspektrum detektiert werden kann. Ein solcher Effekt findet bekannterweise zwischen der GCP-Einheit und Carboxylaten statt und eignet sich hervorragend zur Bestimmung von Bindungskonstanten. Es wird eine Wasserstoffbrücke gebildet, was zu einer Abnahme der Absorption der Pyrrolbande bei 300 nm führt. Um weiteren Effekten, wie z. B. einer pH-Änderung vorzubeugen, wurden alle Messungen in Puffer bei konstantem pH durchgeführt und im Anschluss einer jeden Messung der pH kontrolliert. Dies ist notwendig, da bereits kleinste pH-Änderungen das Ergebnis verfälschen können. Durch eine pH-Änderung erfolgt wie in Abschnitt 4.1.2 bei der Bestimmung des  $\text{pK}_s$ -Wertes dargestellt auch eine Änderung der Absorptionsspektren, was die Bindungsisotherme und damit die Bindungskonstante beeinflussen könnte. Die Titration wurde durchgeführt, indem Aliquots eines Substrats zum Rezeptor titriert und die jeweiligen

UV/Vis-Spektren aufgenommen wurden. Eine erfolgreiche Komplexierung zeigt eine Änderung in der Absorption, die sich von der bloßen Verdünnung unterscheidet.

Zunächst wurden verschiedenste Substrate in einem Schnellverfahren gemessen, um die Spezifität des Rezeptors zu prüfen. Am Beispiel der Titration von Rezeptor **65** mit Cytidinmonophosphat (CMP, **75**) soll diese Vorgehensweise erläutert werden. Der Rezeptor **65** wurde in einem BIS-TRIS-Puffer (0.02 M, pH 6.0) mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  vorgelegt. Dabei wurde aufgrund der unvollständigen Löslichkeit in Wasser eine 1.0 mM Stammlösung in DMSO eingesetzt und dadurch ein finaler DMSO-Anteil von 0.5 % erhalten. Die Substrate wurden im gleichen Puffer mit einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  angesetzt und zum Rezeptor **65** titriert. Dabei wurden für diese Übersichtsmessung Aliquots von nacheinander 5  $\mu\text{l}$ , 45  $\mu\text{l}$  und 25  $\mu\text{l}$  gewählt, was einem Substratüberschuss von 1 Äq., 10 Äq. und 15 Äq. entspricht. Parallel dazu wurden in gleicher Weise der Rezeptor mit Lösemittel verdünnt (siehe Abb. 4-32a) bzw. Lösemittel mit Substrat (siehe Abb. 4-32b) angereichert. Die gemessene Absorption der Titration (siehe Abb. 4-32c) konnte somit direkt gegen die Verdünnung von Rezeptor und Substrat korrigiert werden.

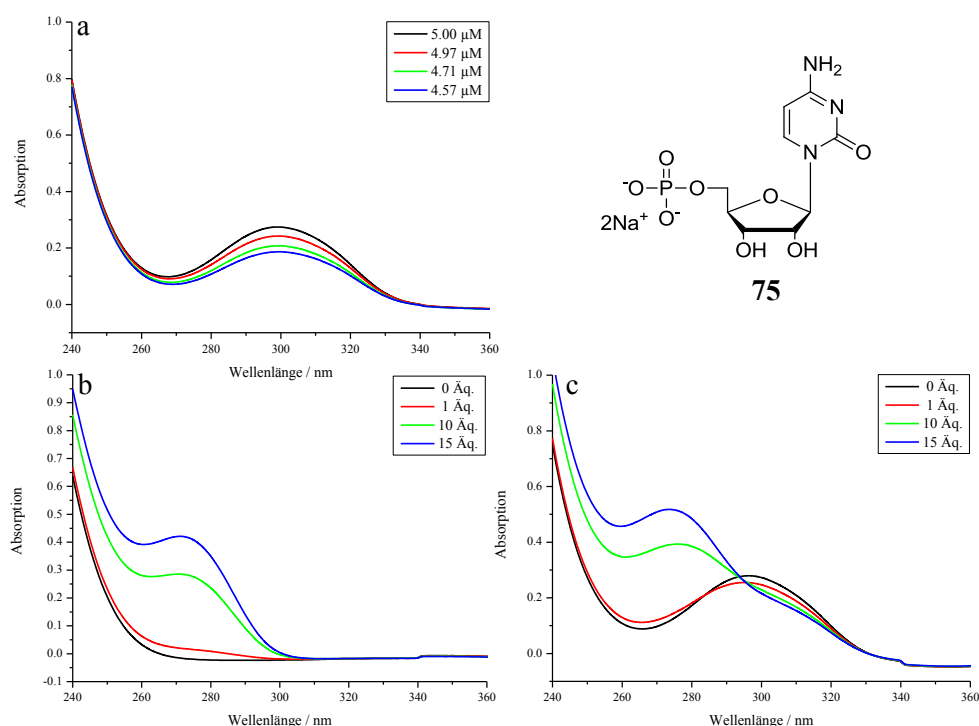


Abb. 4-32 Dargestellt wird die Änderung in der Absorption bei der Verdünnung des Rezeptors **65** (a), der Anreicherung des CMP (b) und der Titration von CMP zu **65** (c).

Im Allgemeinen tragen alle drei Komponenten entsprechend Gl. 4-1 zur gemessenen Absorption bei.

$$A_{obs} = \varepsilon_H [H]_t + \varepsilon_g [G]_t + \Delta\varepsilon [C] \quad \text{Gl. 4-1}$$

Hier sieht man, dass sich die Absorptionkurven bei der Titration von Substrat zu Rezeptor von denen der reinen Verdünnung des Rezeptors bzw. der Anreicherung des Substrates voneinander unterscheiden. Das heißt, dass die Änderung in der Absorption durch eine Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Substrat zustandekommt. In diesem Beispiel deutet sich anhand der sich in nur einem Punkt schneidenden Absorptionskurven ein isosbestischer Punkt an, welcher ein Hinweis darauf ist, dass ein System aus zwei Zuständen vorliegt (siehe Abb. 4-32c). Insgesamt wurden für die meisten Substrate eine Änderung und damit eine mögliche Wechselwirkung beobachtet. Die Änderungen variieren in einem sehr geringen Absorptionsbereich und stoßen damit an die Grenze der Messgenauigkeit des UV-Gerätes. Deshalb werden sie lediglich als eine erste qualitative Übersicht betrachtet und können nicht für eine quantitative Berechnung verwendet werden. Nach Korrektur um die Verdünnung und Anreicherung war in den meisten Fällen eine Abnahme der Absorption bei einem UV-Maximum des Rezeptors bei 297 nm zu beobachten, welche in Abb. 4-33 als Absolutwerte gegeneinander aufgetragen wurden.

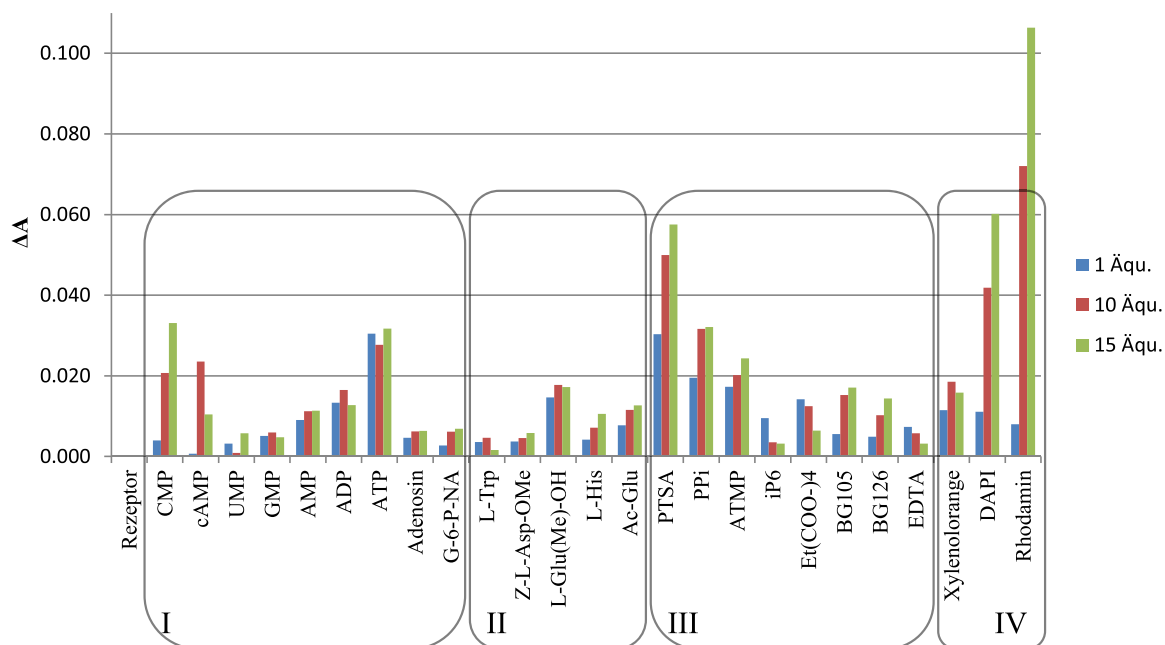


Abb. 4-33 Auftragung der absoluten Veränderungen der Absorption durch Titration von **65** mit verschiedenen Substraten mit einem Überschuss an Substrat nach jeder Zugabe von 1 Äq., 10 Äq. und 15 Äq. in BIS-TRIS-Puffer. Die berechnete Änderung in der Absorption ist der Mittelwert über mindestens zwei Messungen je Titration und auch je Verdünnung bzw. Anreicherung. (Bezeichnungen siehe Anhang S. 189)

Es scheint bei den meisten Substanzen eine Wechselwirkung aufzutreten. Auf besonders starke Wechselwirkungen weisen die Messungen hin, bei denen bereits nach einem geringen Überschuss an Substrat eine endgültige Gleichgewichtseinstellung stattgefunden hat. Plötzliche Abnahmen im Verlauf der Zugaben sind durch Messungenauigkeiten zu erklären und deshalb zu vernachlässigen. Zur besseren Veranschaulichung werden die verschiedenen Substanzklassen einzeln betrachtet. Den ersten Block bilden verschiedene Nucleotide, wobei hier auch das Nucleosid Adenosin und der Zucker D-Glucose-6-Phosphat-Mononatriumsalz (G-6-P-Na) aufgelistet sind. Hier fällt auf, dass es sowohl Unterschiede abhängig von der Nucleobase gibt, z. B. beim Vergleich der Monophosphate CMP, GMP und AMP. Sehr deutlich ist eine Änderung für die Nucleotide AMP, ADP und ATP bei denen auch eine Tendenz mit steigendem Phosphatgehalt zu erkennen ist. Das einzige Substrat ohne Phosphat-Funktionalität ist Adenosin und auch hier sieht man einen Effekt wenn auch geringer als für die entsprechenden Phosphate. Betrachtet man die gemessenen Aminosäuren (Abb. 4-33 Block II) sieht man deutliche Unterschiede je nach vorhandenen Resten. Dabei fällt auf, dass die Glu- und Asp-Derivate ein Bindungsmaximum eher erreichen als das basische His oder das hydrophobe Trp. Die dritte Gruppe besteht aus mehrfach geladenen Substraten wobei hier ein aromatisches Tetra-Sulfit (PTSA), mehrfach Carboxylate (Tetranatrium 1,1,2,2-Ethantetracarboxylat ( $\text{EtCOO}^-$ )<sub>4</sub>, BG105<sup>118</sup>, BG126<sup>118</sup>, EDTA) und mehrfach Phosphate (PPi, iP6) und Phosphonate (ATMP) verwendet wurden. Doch trotz der hohen Anzahl an möglichen elektrostatischen Wechselwirkungen gibt es aufgrund des polaren Lösemittels keine deutlicheren Effekte. Die letzte Gruppe enthält farbige aromatische Systeme, bei denen eine Reproduzierbarkeit der Messung jedoch aufgrund von Niederschlagsbildung, nicht gegeben war.

Diese Übersichtsmessung hat gezeigt, dass der Rezeptor **65** mit seinen sowohl polaren als auch hydrophoben Anteilen das Potential zur Ausbildung von Wechselwirkung mit verschiedensten Substratklassen mitbringt.

Um nun diese Wechselwirkung quantifizieren zu können, wurde eine Auswahl an Carboxylaten und Phosphaten getroffen, mit denen genauere Informationen bezüglich Affinität und Stöchiometrie gewonnen werden sollten. Fast alle verwendeten Substrate sind negativ geladen und sollten dadurch eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Rezeptor ermöglichen. Zudem weisen die Substrate auch Wasserstoffbrücken-Donoren sowie Wasserstoffbrücken-Akzeptoren auf, was zu einer zusätzlichen Stabilisierung der gebildeten Komplexe in wässriger Lösung führen kann. Dabei sollten v. a. auch die sauren Aminosäuren Glu und Asp, welche als „*hot spots*“ auf der Oberfläche von P97 zu finden sind,



im Detail untersucht werden. Die herausragenden Effekte mit den Nucleotiden erlaubt gegebenenfalls eine Wechselwirkung mit Nucleinsäuren, welche im Folgenden auch vorgestellt wird.

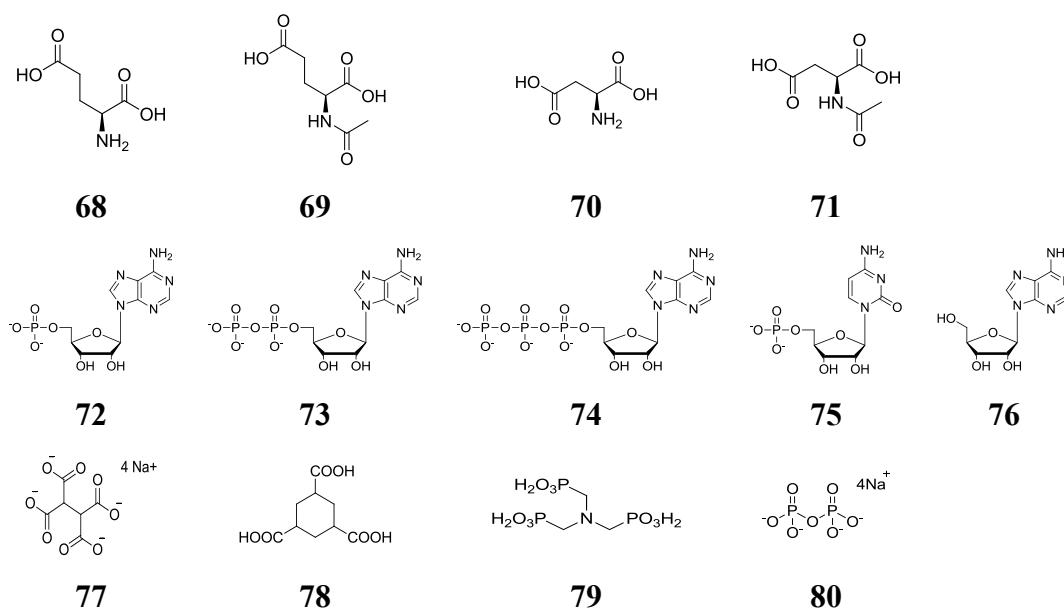


Abb. 4-34 Ausgewählte Substrate für Bindungsstudien mit Rezeptor **65**.

Bevor die eigentlichen Bindungsstudien durchgeführt wurden, mussten zunächst Job-Plots zur Bestimmung der jeweiligen Komplexstöchiometrie aufgenommen werden. Dabei sind sowohl Komplexierungen von **65** durch mehrere Substrate als auch die mehrfache Komplexierung eines Substrates mit **65** denkbar. Es wurden äquimolare Lösungen in TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6.0, 1 % DMSO) mit einer Konzentration von 0.01 mM an Rezeptor und Substrat eingesetzt und aus diesen die jeweiligen Gemische hergestellt. Dabei wurde mit einer Rezeptorlösung begonnen und durch Entnahme von Rezeptorlösung und Zugabe von Substrat nach und nach das Verhältnis von Rezeptor zu Substrat verändert und jeweils ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass Fehlerquellen, welche durch den Einsatz von verschiedenen Küvetten auftreten können, vermieden wurden. Die Job-Plot-Bestimmung ergab schließlich zwei verschiedene Gruppen von Komplex-Zusammensetzungen. Solche, die hauptsächlich ein äquimolares Verhältnis von Substrat zu Rezeptor und damit einen 1:1-Komplex ausbilden, und solche, die sich aus zwei Rezeptoren und einem Substrat zusammensetzten, also einen 2:1-Komplex ausbilden. Wie in Abb. 4-35 dargestellt, zeigen die acetylierten Aminosäuren Glutaminsäure **69** und Asparaginsäure **71** zudem auch Adenosin **76** als ungeladene Verbindung einen 1:1-Komplex mit **65**. Für ATP **74** dagegen sieht man zwei Maxima bei einem Molenbruch von 0.2 und 0.5, was einem 4:1 und einem 1:1-Komplex entspräche und damit auf einen komplexeren Bindungsmodus hinweist. Aus diesen Daten lässt sich jedoch nicht bestimmen, ob mehrere

Komplexe nebeneinander vorliegen oder zunächst der eine und bei weiterem Substratüberschuss der andere gebildet wird. Dies hängt von der Stabilität der jeweiligen Komplexe ab. Für eine später Berechnung wird in erster Näherung ein 1:1-Komplex angenommen, da Berechnungen mit *SpecFit* auch unter Annahme mehrere nebeneinander liegender Komplexe die Bindungskonstante für einen 1:1-Komplex jeweils in vergleichbarer Größenordnung bestimmten.

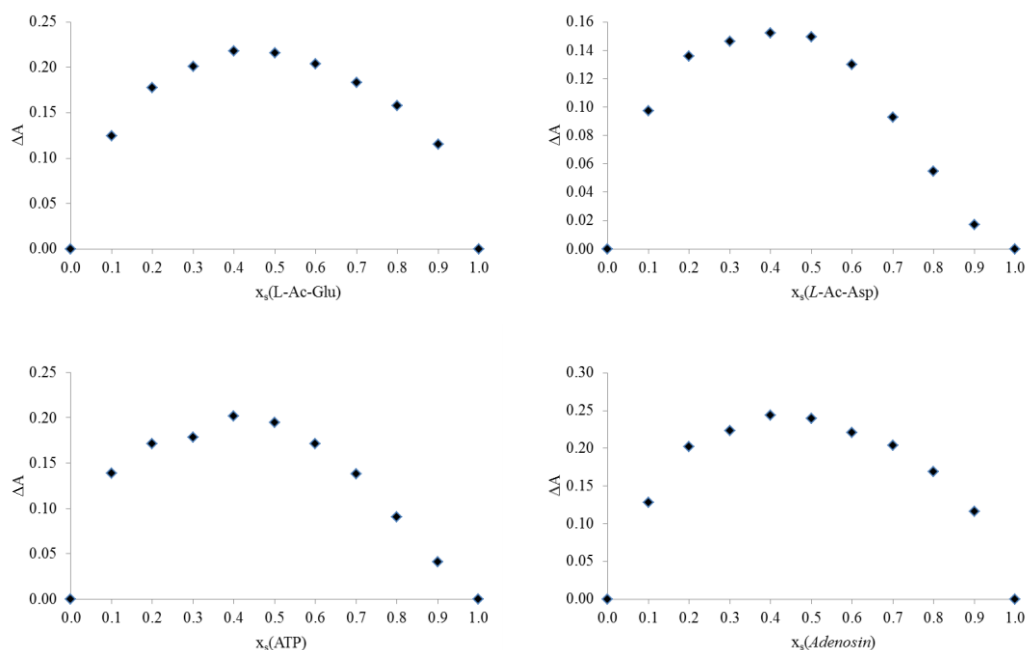


Abb. 4-35 Job-Plots für die 1:1-Komplexe aus Rezeptor **65** (0.01 mM) und L-Ac-Glu, L-Ac-Asp, Adenosin und ATP (0.01 mM) in TRIS-Puffer (0.01 M, pH = 6.0, 1 % DMSO).

Zur Veranschaulichung des gebildeten Komplexes aus **65** und ATP wurden Kraftfeldrechnungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle vier GCP-Gruppen an der Wechselwirkung beteiligt sind, wobei sieben Wasserstoffbrückenbindungen über die Phosphate und je zwei über die OH-Gruppen des Zuckers ausgebildet werden. Es wird deutlich, dass die Nucleobase nicht bis in das Innere des Calix[4]arens **65** vordringen kann um  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen auszuüben, jedoch deutet sich eine Wechselwirkung mit einem Pyrrolring an. Betrachtet man im Vergleich einen theoretischen 1:1-Komplex aus **65** und AMP, findet man eine deutlich geringere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen. Dies führt zu einem deutlich geringeren Energiegewinn bei der Bildung des Komplexes, weshalb hier ein 1:1-Komplex nicht die stabilste Stöchiometrie darstellt.

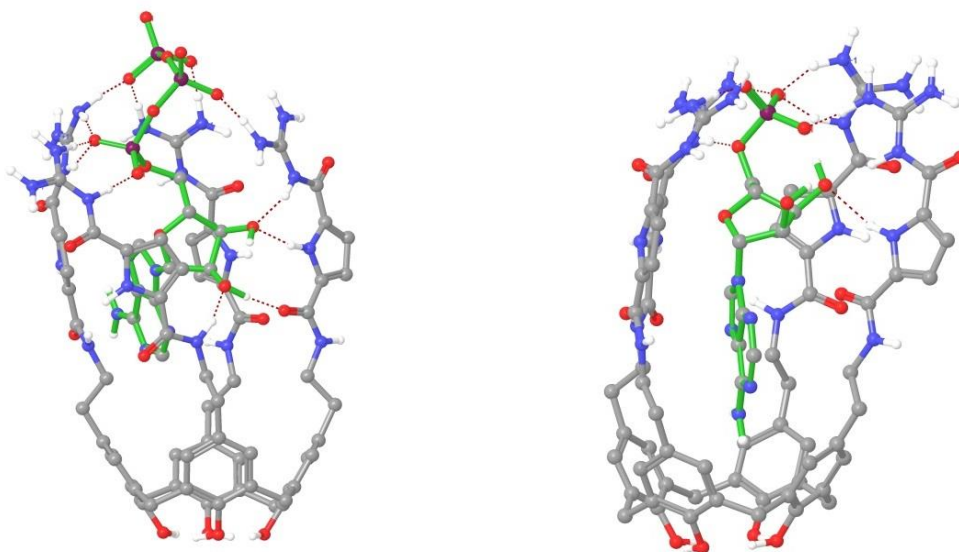


Abb. 4-36 Kraftfeldrechnung des 1:1-Komplexes aus Rezeptor **65** und ATP (links) und eines theoretischen 1:1-Komplexes mit AMP (rechts). Als Kraftfeld diente OPLS\_2005\* mit Wasser als Kontinuum-Lösemittel. Abgebildet sind nur die polaren Wasserstoffe, die Bindungen des Substrates sind grün und die Wasserstoffbrückenbindungen sind rot gestrichelt.

Dagegen findet man für die ungeschützten Aminosäuren **68** und **70** und für die Mono- und Dinucleotide (**72**, **73**, **75**) aber auch für das Ethantetracarboxylat **77** 2:1-Komplexe. Für diese Substrate ist eine Wechselwirkung von zwei Calixarenen über ein Substrat, aufgrund einer möglichen Wechselwirkung zwischen zwei Rezeptoren denkbar. Da bei pH 6 nicht alle Guanidino-Funktionen protoniert sind, erfolgt auch keine Abstoßung der Liganden untereinander.

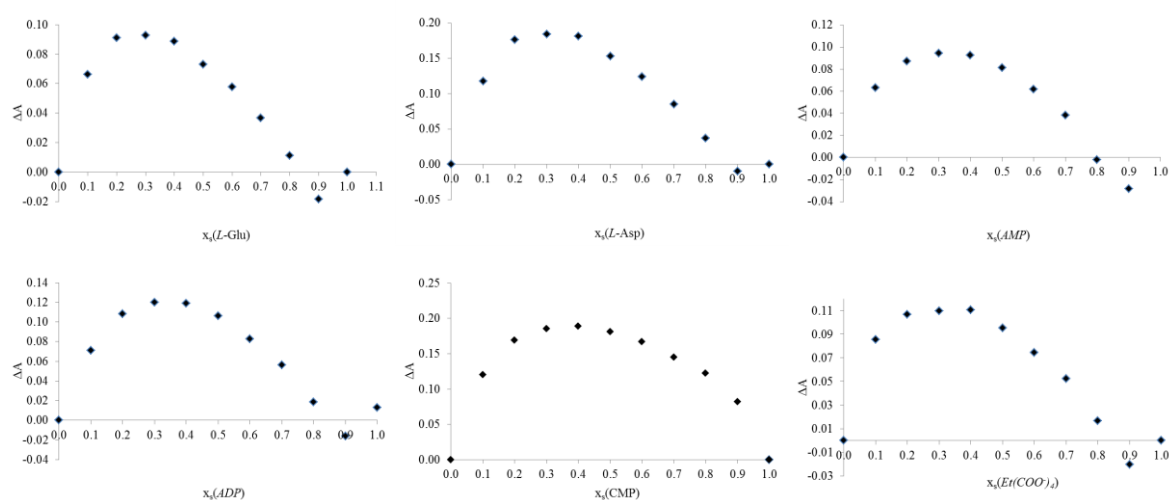


Abb. 4-37 Job-Plots für die Komplexe aus dem Rezeptor **65** (0.01 mM) und L-Glu, L-Asp, AMP, ADP, CMP und Et(COO)<sub>4</sub> (je 0.01 mM) in TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6.0, 1 % DMSO).

Hier ergaben durchgeführte Kraftfeldrechnungen, z. B. für einen 2:1-Komplex von **65** und AMP, eine Ausbildung von sieben Wasserstoffbrückenbindungen über das Phosphat mit je zwei benachbarten Liganden eines jeden Rezeptors **65** und drei ionischen Wechselwirkungen (siehe Abb. 4-38). Dabei werden auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Liganden der beiden Rezeptoren ausgebildet.

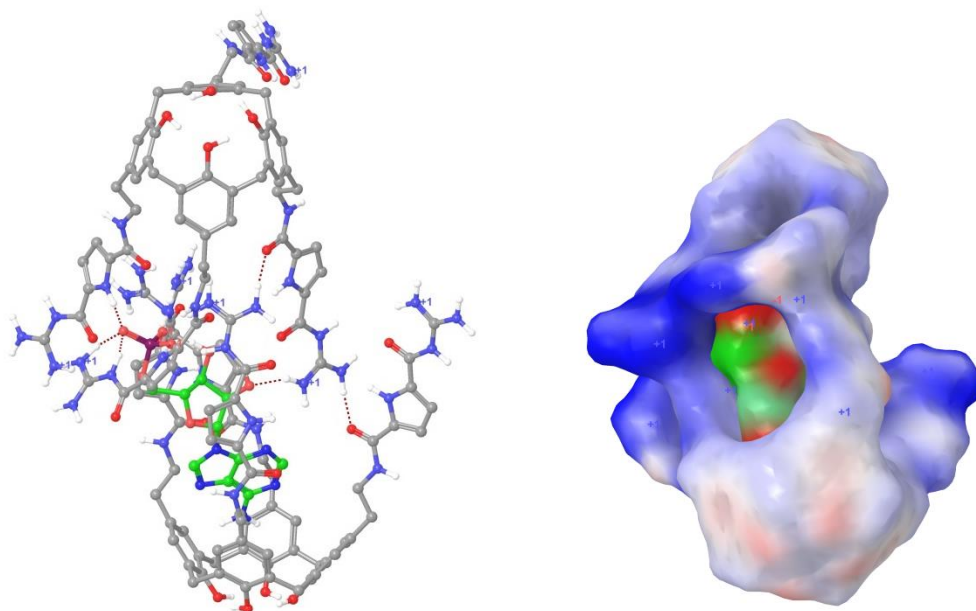


Abb. 4-38 Kraftfeldrechnung des 2:1-Komplexes aus **65** und ATP. Als Kraftfeld diente OPLS\_2005\* mit Wasser als Kontinuum-Lösemittel. Links: „Ball & Stick“ Darstellung. Abgebildet sind nur die polaren Wasserstoffe, die Bindungen des Substrates sind grün und die Wasserstoffbrückenbindungen sind rot gestrichelt. Rechts: Darstellung des elektrostatischen Potentials „bindings site surface“ berechnet mit Maestro: blau = positive Teilladung, rot = negative Teilladung.

Mit dieser Kenntnis wurden die Bindungskonstanten der ausgewählten Substrate über eine UV-Titration bestimmt. Im Vergleich zur ersten Übersichtsmessung sind hier für eine größere Genauigkeit deutlich mehr Titrationsschritte notwendig, um die erhaltene Bindungsisotherme für eine korrekte Bestimmung der Bindungskonstanten nutzen zu können. Wichtig ist dabei das Verhältnis der erhaltenen Komplexkonzentration zur eingesetzten Substratkonzentration. Das Ziel ist eine hohe Datendichte in dem Bereich der Bindungsisotherme, in dem ein linearer Anstieg in eine Komplexsättigung übergeht. Für die Titrationen wurde der Rezeptor **65** in TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6.0) und 1 % DMSO mit einer Konzentration von 5  $\mu$ M vorgelegt. Während einer UV-Titration wurde die Rezeptorlösung in einer Küvette vorgelegt und eine Substratlösung, von z. B. *L*-Glu (0.01 M), dazu titriert. Das Absorptionsspektrum wurde in einem Bereich von 240 nm bis 350 nm aufgenommen. In Abb. 4-39 ist die erhaltene Abnahme der Absorption für **65** während der Zugabe von *L*-Glu, welches selbst keine Absorption aufweist, angegeben. Mithilfe von *SpecFit* wurde die Bindungsisotherme für

einen 2:1-Komplex bestimmt und über eine nicht-lineare Regression eine Bindungskonstante von  $\log K = 10.01$  bestimmt.

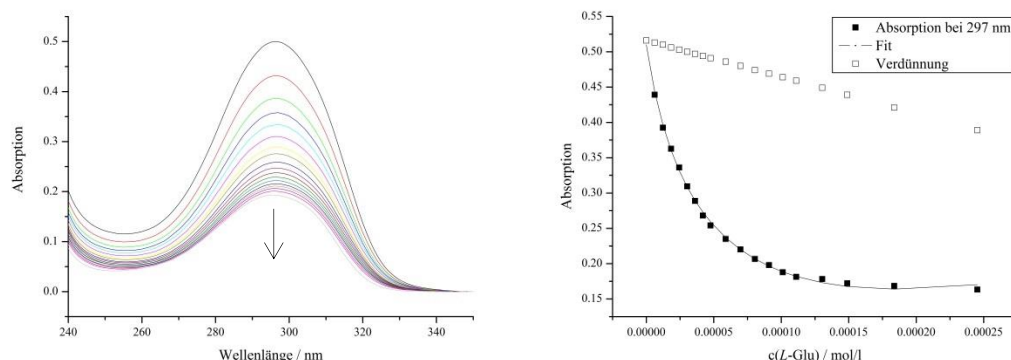


Abb. 4-39 (links) Abnahme der Absorption während einer UV-Titration von **65** mit L-Glu. (rechts) Berechnete Bindungsisotherme mit Kurvenanpassung und theoretischer Verdünnung von **65**.

Entsprechend diesem Beispiel wurden die Bindungskonstanten für die anderen Substrate bestimmt (Abb. 4-40).

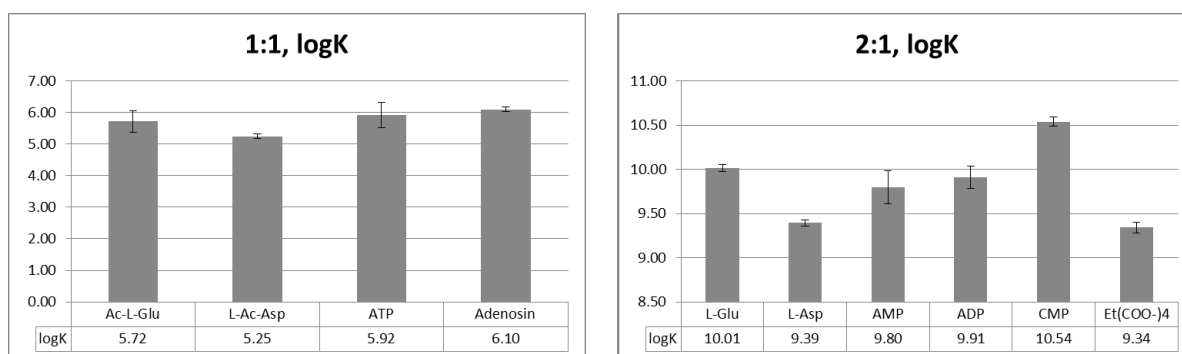


Abb. 4-40 Ermittelte Bindungskonstanten der UV/Vis-Titration von Rezeptor **65-HCl** mit verschiedenen Aminosäuren und Nucleotiden bei pH 6. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Messungen. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Ein Vergleich der erhaltenen Bindungskonstanten zeigt für die 1:1-Komplexe Werte im Bereich von  $\log K = 5 - 6$ . Dabei fällt auf, dass sich die beiden Aminosäuren um  $\log K = 0.47$  unterscheiden, wobei man die höhere Bindungskonstante von  $\log K = 5.72$  für Ac-L-Glu gegenüber  $\log K = 5.25$  für Ac-L-Asp den unterschiedlich langen Seitenketten zuweisen könnte. Durch die längere Seitenkette werden möglicherweise Wechselwirkungen über einen weiteren Liganden ausgebildet. ATP zeigt mit  $\log K = 5.92$  eine höhere Bindungskonstante als die beiden acetylierten Aminosäuren. Eine entsprechend hohe Bindungskonstante des weniger polaren Adenosins mit  $\log K = 6.1$  lässt darauf schließen, dass hier elektrostatische Wechselwirkung nicht die entscheidende Rolle spielen. Es ist aber denkbar, dass dieses aufgrund der fehlenden Phosphatgruppe nicht mit den polaren Liganden am äußeren Rand

wechselwirkt, sondern mit seiner Nucleobase in die Kavität des Calixarenes eindringt und durch hydrophobe Effekte ebenfalls zu einem deutlichen Energiegewinn führt.

Bei den 2:1-Komplexen zeigt sich eine vergleichbare Größenordnung sowohl für Phosphate als auch für die Carboxylate. Vergleicht man die Nucleotide AMP und ADP mit CMP, wird eine Nucleobasen-Selektivität deutlich. Obwohl bei den Nucleotiden die Bindungsstärke mit den Ladungen zunimmt, gilt dies nicht für das 1,1,2,2-Ethancarboxylat  $\text{Et}(\text{COO}^-)_4$  **77**. Dieses weist mit seinen vier Carboxylaten eine sehr hohe Ladungsdichte auf, ist jedoch sehr kompakt und erschwert damit eine Wechselwirkung mit mehreren GCP-Liganden.

Die Bindungskonstanten von Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzungen lassen sich nicht miteinander vergleichen. Betrachtet man jedoch die acetylierten Aminosäuren mit den ungeschützten, findet man in beiden Fällen, dass die Bindungskonstante für das Glutaminsäureanalogon jeweils höher ist als für das Asparaginsäureanalogon. Es wird vermutet, dass die acetylierten Aminosäuren aufgrund der geschützten Aminogruppe tiefer in die Kavität eindringen und es deshalb zwischen zwei Calixarenen eher zu einer Abstoßung durch die positiv geladenen Guanidiniumgruppen kommt.

Nachdem die Ergebnisse der UV/Vis-Spektroskopie besprochen wurden, werden im folgenden Abschnitt die Messergebnisse der Isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC), als weitere unabhängige Methode vorgestellt und diskutiert.

Die Isothermale Titrationskalorimetrie eröffnet die Möglichkeit, sowohl die Bindungskonstante  $K_{\text{Ass}}$  und die Stöchiometrie  $n$ , als auch die Bindungsenthalpie  $\Delta H$  mit einem einzigen Experiment zu ermitteln (Details dazu siehe S. 43). Mit diesen Werten kann dann die Bindungsentropie  $\Delta S$  berechnet werden. Die Messbedingungen wurden mit Hilfe eines einheitslosen Faktors  $C$  bestimmt, für welchen die Formel  $C = K \cdot n \cdot c$  gilt. Nur für Werte zwischen 1 und 1000 erhält man eine deutliche Sigmoidfunktion, welche dann mit einer Zusatzsoftware für *Origin* von *MicroCal* gefittet werden kann. Unter der Annahme einer Bindungskonstante im Bereich von  $10^6 \text{ M}^{-1}$  wurde daher die Konzentration des Calixarens **65** auf 0.1 mM eingestellt und eine ATP-Lösung mit einer Konzentration von 1.5 mM verwendet. Die Lösemittel wurden jeweils vor der Messung unter Einleitung von Helium entgast, um der Problematik von Bläschenbildung während einer Messung entgegenzuwirken. Die Referenzzelle wurde mit entgastem Reinstwasser gefüllt. Die Titrationsen wurden bei 25 °C durchgeführt, indem 7  $\mu\text{l}$  der ATP-Lösung bei einer Rührgeschwindigkeit von 307 Umdrehungen pro Minute zugegeben wurden. Aufgrund von schlechter Löslichkeit bei den höheren Konzentrationen, welche für die ITC-Messung notwendig waren, musste der DMSO-Anteil im Vergleich zu den UV/Vis-Messungen auf 10 % erhöht werden. Zur Korrektur der

auf tretenden Verdünnungswärmen wurden Referenzexperimente sowohl bei Zugabe von reinem Lösemittel zum Calixaren **65**, als auch von ATP zu Puffer durchgeführt.

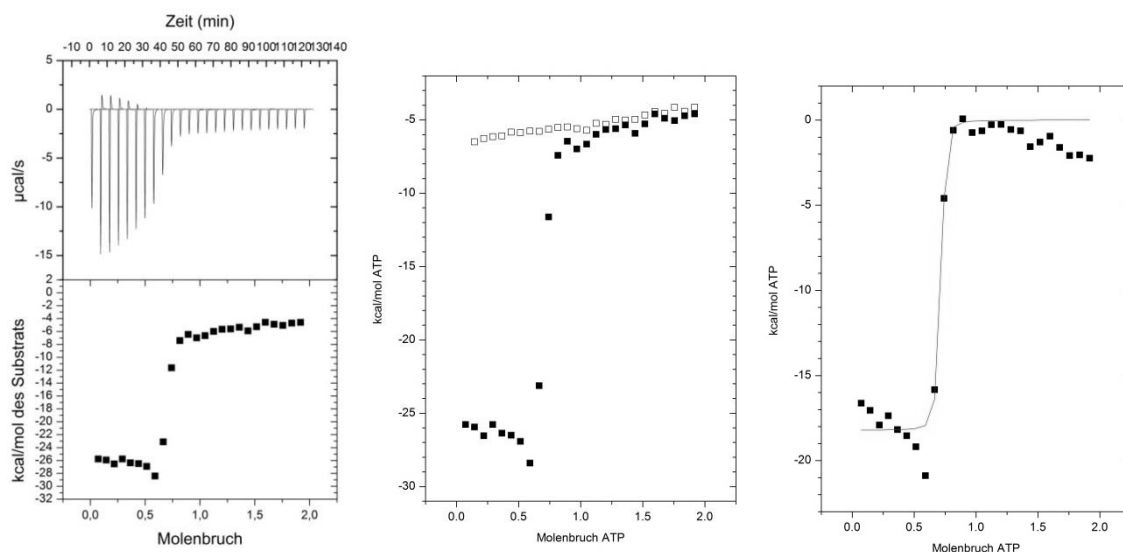


Abb. 4-41 Bedingungen: 1.5 mM Nucleotid **74** in der Spritze, 0.1 mM **65** in der Zelle, TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6, 10 % DMSO). Die Sigmoid-Kurve wurde durch Integration der freiwerdenden Wärmemenge (links) erhalten, welche mit den Daten aus dem Verdünnungsexperiment (Mitte) korrigiert und mit dem „one set of sites“-Bindungsmodell gefittet wurde (rechts).

Dabei wurde die freiwerdende Wärmemenge aufgenommen und durch Integration eine typische Sigmoid-Kurve erhalten. Die Wärmetönung der Titration von Rezeptor **65** mit ATP **74** ist exotherm und liegt in einem Bereich von 1-15  $\mu\text{cal/s}$  (siehe Abb. 4-41 links). Eine abnehmende Wärmeentwicklung bei Zugabe des Substrates **74** aus der Spritze ist durch eine hohe Verdünnung zu erwarten und wurde, wie in Abb. 4-41 Mitte dargestellt, bestimmt und für eine spätere Berechnung berücksichtigt. Die Wärmetönung durch eine Verdünnung des Calixarenes in der Küvette war dagegen zu vernachlässigen. Die um die Verdünnung korrigierte Kurve ließ sich mit einem „one set of sites“-Bindungsmodell mittels nicht-linearer Regression berechnen (siehe Abb. 4-41 rechts). Es wurde ein thermodynamisches Profil dieser Komplexbildungsreaktion mit einer Stöchiometrie von 3:2 = Rezeptor:Substrat mit einer freien Bindungsenergie  $\Delta G$  von -10259.4 kJ/mol erhalten.

Entsprechend wurde mit den beiden anderen Nucleotiden ADP und AMP vorgegangen (siehe Abb. 4-42). Die Wärmetönung mit 0-10  $\mu\text{cal/s}$  der Titration von Rezeptor **65** mit ADM ist geringfügig geringer als die für die vorherige Messung mit ATP (Abb. 4-42 links). Dagegen erhält man bei einer Titration mit AMP nur noch eine Wärmetönung kleiner 2  $\mu\text{M}$  (siehe Abb. 4-41 rechts). Die Wechselwirkung mit AMP ist unter den Bedingungen bereits so schwach, dass keine deutlich sigmoidale Kurve gewonnen werden konnte. Um dies zu optimieren müsste man höhere Konzentrationen verwendet, was aber aufgrund der mangelnden

Löslichkeit nicht möglich war. Eine durchgeführte Auswertung der ITC-Messung mit AMP kann demnach nur als erste grobe Übersicht angesehen werden.

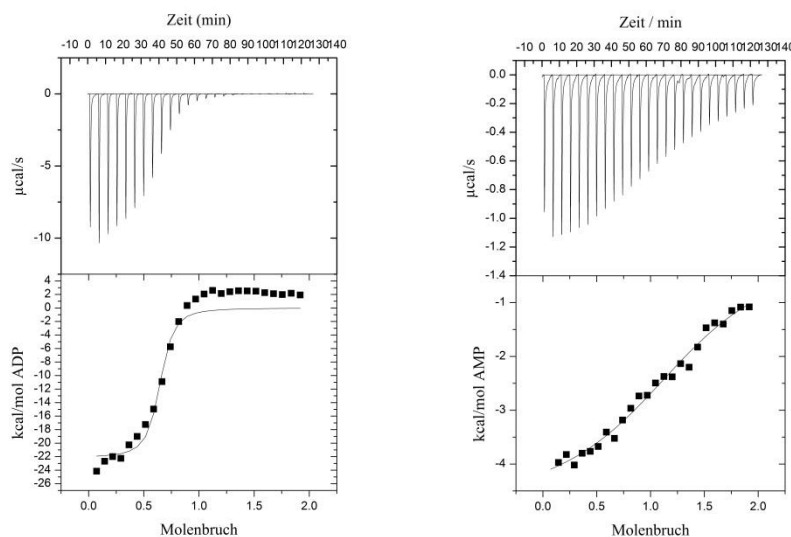


Abb. 4-42 1.5 mM Nucleotid in der Spritze (links ADP, rechts AMP), 0.1 mM **65** in der Zelle, TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6, 10 % DMSO). Die Sigmoid-Kurve, wurde durch Integration der freiwerdenden Wärmemenge erhalten und mit den Daten aus dem Verdünnungsexperiment korrigiert. Der Fit erfolgte über ein „one set of sites“-Bindungsmodell.

Vergleicht man die ITC-Messungen der drei Nucleotide, welche unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigt sich eine ansteigende Bindungsaffinität mit zunehmender Ladung. Aus energetischer Sicht zeigte die ITC-Messung, dass die Komplexbildung mit ATP und ADP exotherm in einem Bereich von  $-10^{-4}$  kJ/mol ist aber zudem auch einen ungünstigen entropischen Anteil von -30 bis -50 kJ/(mol·K) aufweist.

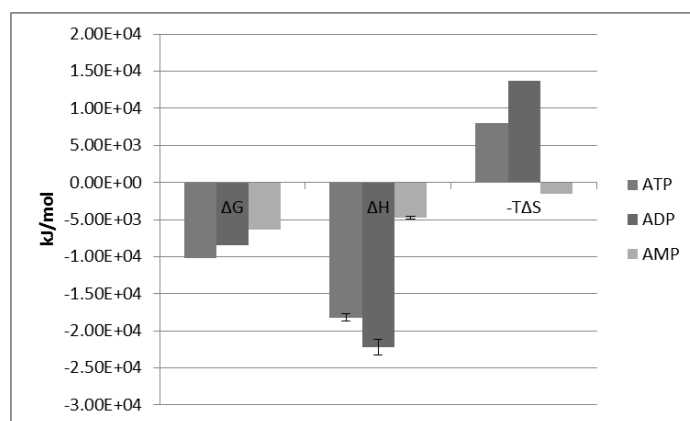


Abb. 4-43 Thermodynamisches Profil der ITC-Bestimmung der Komplexbildung von **65** und den Nucleotiden ATP, ADP und AMP.

Ein quantitativer Vergleich der ITC-Messungen mit den UV/Vis-Titrationsen ist nicht realisierbar, da es Unterschiede bei der Stöchiometrie gibt. Bei beiden findet man den Trend einer stärkeren Wechselwirkung mit zunehmender Ladung von AMP über ADP nach ATP.



ITC	ATP	ADP	AMP
N	$0.68 \pm 0.0085$	$0.62 \pm 0.019$	$1.36 \pm 0.027$
$K / M^{-1}$	$3.19 \cdot 10^7 \pm 3.6 \cdot 10^7$	$1.63 \cdot 10^6 \pm 9.7 \cdot 10^5$	$4.49 \cdot 10^4 \pm 7.0 \cdot 10^3$
$\Delta H / kJ/mol$	$-1.82 \cdot 10^4 \pm 486$	$-2.22 \cdot 10^4 \pm 1.03 \cdot 10^3$	$-4803 \pm 178$
$\Delta S / kJ/(mol \cdot K)$	-26.7	-45.9	5.18
$\Delta G / kJ/mol$	$-1.02 \cdot 10^4$	$-8.51 \cdot 10^3$	

UV			
N	1	0.5	0.5
$K / M^{-1}$	$8.34 \cdot 10^5$	$8.13 \cdot 10^9$	$6.31 \cdot 10^9$

Tab. 4-1 Oben: Ergebnisse der ITC-Titrationen von **65** mit den Nucleotiden in TRIS-Puffer/10 % DMSO. Bestimmung thermodynamische Parameter über nicht-lineare Regression anhand eines „one set of sites“ Bindungsmodells. Unten: Ergebnisse der UV/Vis-Titrationen von **65** mit den Nucleotiden in TRIS-Puffer/1 % DMSO. N: Molenbruch des jeweiligen Substrats.

Abweichungen bei der Stöchiometrie, werden sowohl auf eine erhöhte Konzentration von Rezeptor und Substrat als auch einen erhöhten DMSO-Anteil zurückgeführt. Für ATP findet man mithilfe der ITC-Messung eine Bindungskonstante, welche zwei Zehnerpotenzen höher ist als bei der UV-Titration. Die ITC-Titration liefert aber auch eine Zusammensetzung von Calixaren zu ATP von 3:2. Die Job-Plot Bestimmung ergab dagegen zwei Maxima für eine Komplexzusammensetzung von 4:1 und 1:1 (Übersicht Tab. 4-1).

Bei einem Vergleich dieser beiden Methoden zur Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen dem Rezeptor **65** und den Nucleotiden, ATP, ADP und AMP zeigte sich für beide eine entsprechende Tendenz, was den Vergleich zwischen den Nucleotiden angeht. Die Bindungskonstante nimmt demnach mit zunehmendem Phosphatanteil auch zu, weil mehr Möglichkeiten zur Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Der Wert der Bindungskonstanten variierte um zwei bis drei Zehnerpotenzen, was aber mit der unterschiedlichen Stöchiometrie zusammenhängt und deshalb nicht direkt verglichen werden kann.

#### 4.1.4 Versuche zur Protein-Oberflächenerkennung von P97 mit Rezeptor 65

Wie in den Grundlagen detailliert beschrieben, stellt das Typ II AAA Protein P97 ein interessantes Zielmolekül für den multivalenten GCP-Rezeptor **65** dar. Es enthält mehrere kritische Untereinheiten, deren Beeinflussung durch einen Rezeptor zu einer veränderten Funktion des Proteins führen könnte, was zur Aufklärung seiner Funktionsmechanismen beitragen soll. Eine interessante Bindungsstelle stellte in dieser Arbeit der Eingang der Pore an der D1-Domäne von P97 dar, welche von zweimal sechs Reihen an sauren Aminosäuren (Glu 319, Glu 283) umgeben wird. Zudem soll mithilfe eines ATPase-Assays, welcher in der AG Meyer am ZMB der Universität Duisburg-Essen praktiziert wird, eine Veränderung der ATPase-Aktivität durch die Oberflächenerkennung mit **65** bestimmt werden. Eine Herausforderung ist immer die Bestimmung der Wechselwirkungen zwischen sehr großen Proteinen und kleinen Rezeptoren. Zunächst einmal wurden Kraftfeldrechnungen in Zusammenarbeit mit *Wilhelm Sicking* durchgeführt, um die Größe des Rezeptors zu überprüfen. Die Berechnung so großer Moleküle erfordert große Rechenkapazitäten, welche in einem vernünftigen Zeitrahmen nicht durchgeführt werden können. Stattdessen wurde ein Bereich um die zu betrachtende Bindungsstelle des P97 ausgeschnitten (siehe Abb. 4-44 gelb gefärbt). Zur Berechnung wurde der ausgeschnittene Bereich des Proteins für die Berechnung eingeschränkt und nur die entscheidenden Aminosäuren an der Pore und das Calixarene **65** für die Berechnung freigegeben.

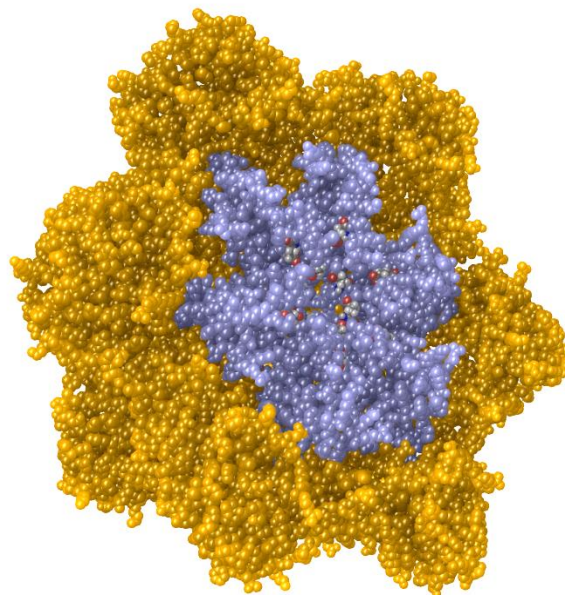


Abb. 4-44 P97 besteht aus sechs identischen Protomeren mit einer zentralen Pore. Der blaue Bereich wurde für Kraftfeldrechnungen verwendet (Aminosäuren 250-350). Die entscheidenden Aminosäuren Glu 283 und Glu 319 sind entsprechend den Elementen gefärbt. Kraftfeldrechnungen wurden in Zusammenarbeit mit *Wilhelm Sicking* durchgeführt.

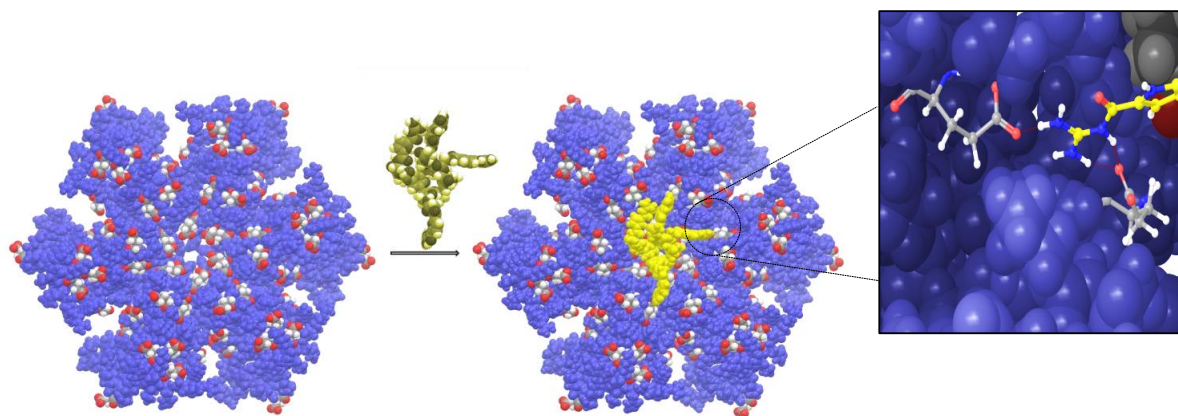


Abb. 4-45 MacroModel 9, Kraftfeld OPLS\_2005, Solvent = Wasser, Global minimum  $E = -47486.16$  kJ/mol, 1000 Zyklen Konformationsanalyse.

Das in Abb. 4-45 dargestellte Ergebnis der durchgeführten Konformationsanalyse zeigt, dass das Calixarene **65** durch seine Größe dazu geeignet ist, gleichzeitig mit mehreren Glutaminsäureresten elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden ( $-47486.16$  kJ/mol) und die Pore dadurch sterisch zu verschließen.

Zur praktischen Bestimmung einer möglichen Wechselwirkung zwischen Rezeptor **65** und P97 wurden dann verschiedene Methoden angewandt. Die Isothermale Titrationskalorimetrie wird in der Biochemie standardmäßig zur Bestimmung der Bindungskonstante von Biomolekülen mit Rezeptoren verwendet. P97 stellt jedoch mit seinen 97 kDa eine große Herausforderung dar, v. a. da es in einem Puffergemisch in einer nur sehr geringen Konzentration zugänglich war. Die Expression und Reinigung des P97 wurde von *Dr. Christina Kamp-Melzer* durchgeführt und P97 wurde mit einer Konzentration von  $4\text{ }\mu\text{M}$  zur Verfügung gestellt.

Das ITC-Experiment wurde unter Zugabe des Rezeptors **65** ( $18.98\text{ }\mu\text{M}$ ) zu P97 ( $3.20\text{ }\mu\text{M}$ ) in HEPES-Puffer (0.02 M, inklusive: 0.13 M KCl, 0.001 M  $\text{MgCl}_2$ , 8 % Glycerin, 20 % DMSO) bei pH 7.4 und  $25\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die Verdünnung des Rezeptors **65** gemessen und bei der Berechnung berücksichtigt. Diese ITC-Messung lieferte eine nur sehr geringe und nahezu linear abnehmende Wärmetönung. Damit ist eine Auswertung zur Bestimmung einer Bindungskonstante kaum aussagekräftig zu realisieren (siehe dazu Tab. 7-3).

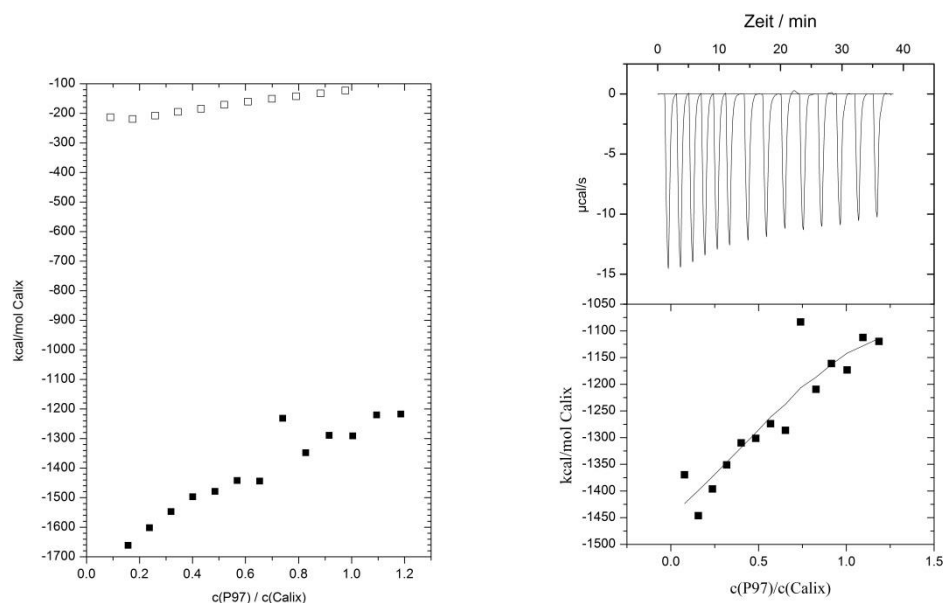


Abb. 4-46 Links: ITC-Experiment unter Zugabe des Rezeptors **65** zu P97 mit zugehöriger Verdünnung. Bedingungen: Lösemittelgemisch: 0.13 M KCl, 0.02 M Hepes pH 7.4, 0.001 M MgCl<sub>2</sub>, 8 % Glycerin, 20 % DMSO,  $c(\text{P97}) = 3.20 \mu\text{M}$ ,  $c(\mathbf{65}) = 18.98 \mu\text{M}$ . Rechts: Berechnete Kurve unter Abzug der Verdünnung nach einem sequentiellen Bindungsmodell.

Betrachtet man dennoch die einzelnen berechneten Parameter, sieht man, dass die Bindungskonstanten hier in einem Bereich zwischen  $10^4 \text{ M}^{-1}$  und  $10^5 \text{ M}^{-1}$  liegen. Die thermodynamischen Parameter variieren stark für die einzelnen stattfindenden Prozesse. Negative Enthalpien könnten aus Wechselwirkungen des Rezeptors mit P97 erzeugt werden. Auch können Konformationsänderungen im Protein nicht ausgeschlossen werden. Diese Messung gibt erste Hinweise, dass sequentielle Prozesse bei der Titration des Rezeptors **65** mit P97 stattfinden. Eine Bindung ist aber aufgrund der geringen vorliegenden Wärmetönung unter den oben genannten Bedingungen jedoch nicht eindeutig bestätigt worden.

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen und niedermolekularen Rezeptoren stellt die Fluoreszenz-Polarisation dar, welche in der *AG Bayer*, in der Fakultät für Biologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt wurde. Diese Messung erwies sich jedoch nach ersten Versuchen als ungeeignet, da die Fluoreszenzbanden des P97 mit denen des Rezeptors **65** überlagern und dadurch eine Auswertung der Messdaten verfälschen.

Eine weitere Methode war die *MicroScale Thermophoresis* (MST), deren Einsatz aufgrund einer Präsentation von *Nanotemper Technologies* ermöglicht wurde. Diese Technik basiert auf der Thermophorese, d. h. der Bewegung von Teilchen aufgrund eines Temperaturgradienten, und erlaubt die Bestimmung von Bindungskonstanten bei

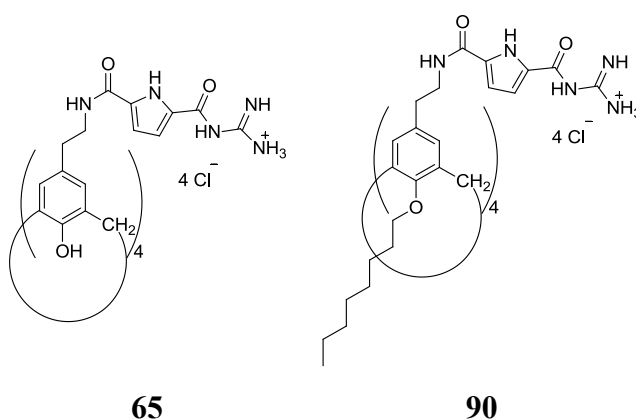
fluoreszierenden Substraten. Jedoch ist für die MST eine relativ hohe Konzentration von 2.48 mM in der oben genannten HEPES-Puffer-Lösung bei 7.4 % notwendig, was den Einsatz von 50 % DMSO erforderte. Kontrollen der Fluoreszenzeigenschaften unter den gegebenen Bedingungen, zeigten eine gute Eignung des Rezeptors **65** und des Proteins P97 für diese Messung. Jedoch wurden unter diesen drastischen Bedingungen mit 50 % DMSO, welche auch für diese Art der Bestimmung nicht geeignet sind, keine Wechselwirkung festgestellt.

Die konkrete Bestimmung der Bindungsaffinitäten konnte letztlich mit den gegebenen Messmethoden nicht erzielt werden.

Die durchgeführten Bindungsstudien wurden dadurch erschwert, dass mit einem Protein, wie P97 mehrere supramolekulare Prozesse möglich sind, welche die spektroskopischen sowie die kalorimetrischen Messungen beeinflussen können. Weiterhin sind die Möglichkeiten der Messungen aufgrund der Löslichkeitseinschränkung des Calixarens **65** bei neutralem pH beeinträchtigt.

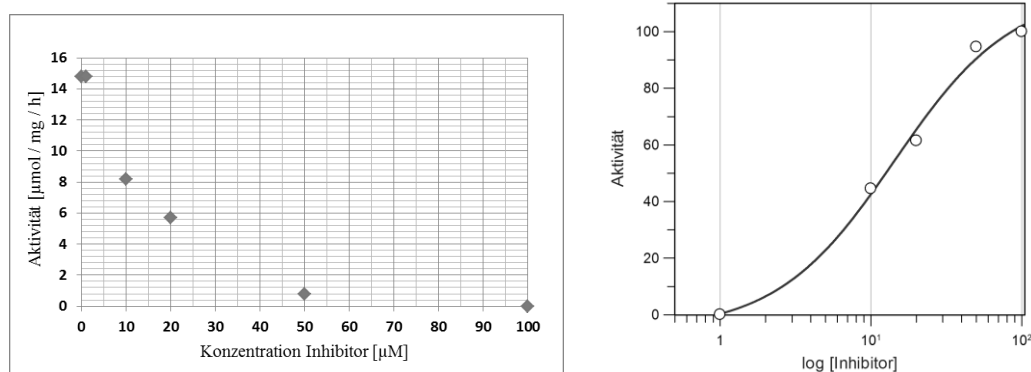
Dagegen konnte aber ein standardisierter ATPase-Assay von *Dr. Christina Kamp-Melzer* in der Arbeitsgruppe von *Prof. Meyer* durchgeführt werden, mit welchem eine Änderung der ATPase Aktivität von P97 bestimmt werden kann.<sup>119</sup> Hierbei wird sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass Orthophosphat  $P_i$ , welches bei der Hydrolyse von ATP frei wird und Hexammonium-Molybdat einen Phosphomolybdenum Komplex bilden. Dieser formt mit Malachitgrün einen grünen Komplex, welcher zu einem Anstieg der UV-Absorption bei 650 nm führt. Diese Messungen wurden für den Rezeptor **65** und einen im nächsten Kapitel vorgestellten Rezeptor **90** in HEPES-Puffer bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt. Zusätzliche Inhaltsstoffe waren KCl,  $MgCl_2$ , Glycerol sowie DTT, um physiologische Bedingungen zu simulieren und eine Oxidation zu verhindern. Für die Hydrolyse war auch ATP (0.2 mM) enthalten.

Die Substrate **65** und **90** wurden in einer Stammlösung aus DMSO in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Zur Durchführung wurden P97 und je einer der beiden Rezeptoren im Reaktionspuffer inkubiert. Die Endkonzentration der potentiellen Inhibitoren **65** und **90** wurde von 1  $\mu$ M



bis 100  $\mu\text{M}$  variiert. Nach Zugabe des Farbreagenzes (10 ml [0.034 % Malachitgrün, 1.04 %  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 1M HCl] + 40  $\mu\text{l}$  10 % Tween 20) und kurzer Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 34 %iger Lösung von Natriumcitrat abgebrochen. Die Absorption wurde bei 650 nm gemessen und eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die beiden Rezeptoren **65** und **90** wurden in den Verhältnissen 1:1, 2:1, 4:1, 10:1 und 20:1 zum Monomer eines P97 eingesetzt. Zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes wurde die Hemmaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt (0, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{M}$ ). Mit den Programmen *GraFit*<sup>®</sup> und *Microsoft Excel* wurden die Steigungen der Geraden und daraus die prozentuale Enzymaktivität sowie der  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmt.

Dabei wurde für **65** keine Veränderung der  $\text{P}_i$ -Produktion detektiert, womit kein Einfluss auf die ATP-Aktivität des Proteins vorliegt. Für **90** wurde jedoch eine Abnahme in der  $\text{P}_i$ -Konzentration gemessen, was auf eine Inhibierung der ATPase-Aktivität schließen lässt.



4-1 ATPase-Assay zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$  einer Inhibierung des P97. Ausgewertet mit *Gafit* für **90**.

Dabei wurde für **90** ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $14.33 \pm 4.34 \mu\text{M}$  bestimmt. Die ATPase Aktivität wird v. a. von der D2-Domäne bestimmt. Der Rezeptor **90** scheint diese möglicherweise aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften besser zu erreichen. Ein Einfluss durch vorliegendes ATP kann durch diese Messungen noch nicht ausgeschlossen werden und muss geprüft werden. Für eine detailliertere Beschreibung des Mechanismus der Inhibierung sind ebenso weitere Messungen erforderlich.

Die durchgeführten Bindungsstudien wurden dadurch erschwert, dass mit einem Protein wie P97 sehr viele Prozesse denkbar sind, welche die spektroskopischen sowie die kalorimetrischen Messungen beeinflussen können. P97 besteht aus sechs identischen Protomeren, deren Aggregation unter physiologischen Bedingungen relativ stabil ist. Es ist aber schwer abzuschätzen, was eine Wechselwirkung mit niedermolekularen Substanzen bewirken könnte. Außerdem handelt es sich um eine ATPase, von der bekannt ist, dass sie während einer Hydrolyse ihre Konformation ändert. Bindungsstudien mit P97 und seinen Cofaktoren werden standardmäßig auch unter Zugabe von ATP und DTT durchgeführt. Für

die ITC-Messungen in dieser Arbeit, war es jedoch nicht enthalten, da der Rezeptor mit ATP wechselwirkt und DTT durch Oxydation mit Luftsauerstoff sich ungünstig auf die Basislinie auswirkt. Diese Einflussnahme auf das P97 war ebenfalls schwer einzuschätzen. Die Auswirkungen des erforderlichen Anteils an DMSO auf die Stabilität des P97 sind ebenso unbekannt. Weiterhin sind die Möglichkeiten der Messungen aufgrund der Löslichkeitseinschränkung des Calixarens **65** bei neutralem pH beeinträchtigt.

Dennoch wurden in dieser Arbeit erste Hinweise auf eine Wechselwirkung des lipophileren Rezeptors **90** mit P97, anhand einer Inhibierung der ATPase-Aktivität, detektiert. Für eine Einstufung des Mechanismus der Inhibierung sind weitere Messungen erforderlich.

## 4.2 EIN SYNTHETISCHER REZEPTORS ZUR GENTRANSFEKTION

Da sich das Calixaren **65** mit seinem aromatischen Grundgerüst und den vier multivalenten GCP-Liganden als geeignet zu Bindung von Nucleotiden erwiesen hat, sollen im folgenden Abschnitt seine Modifikation zu einem Amphiphil mit GCP-Kopfgruppe und lipophiler Octylkette als Schwanzgruppe vorgestellt werden. Um diesen amphiphilen Charakter zu erhalten, ist es notwendig, dass die unterschiedlich polaren Liganden jeweils in dieselbe Richtung weisen und damit die *cone*-Konformation einnehmen.

### 4.2.1 Synthese des amphiphilen Rezeptors **90**

Im folgenden Abschnitt werden zunächst Vorarbeiten zur Entwicklung des Zielrezeptors **90** und im Anschluss die Durchführung seiner Synthese vorgestellt.

Um ein Calix[4]arene in der *cone*-Konformation zu fixieren, können die Hydroxygruppen am *lower rim* mit langen oder sperrigen Resten verethert oder verestert werden. Um zudem auch noch die Wasserlöslichkeit des Moleküls zu erhöhen, eignen sich Glycolketten. Im Vergleich zur ersten Syntheseroute (vgl. Abb. 4-12) kann hier aufgrund der fehlenden Hydroxygruppen jedoch keine Mannich-Reaktion zur Einführung des Ethyllinkers durchgeführt werden. Deshalb wurde hier ein Weg über eine Chlormethylierung gewählt.

Hierbei sind zwei Synthesewege denkbar, wobei Weg A aufgrund der frühzeitigen Einstellung der *cone*-Konformation vorzuziehen ist (siehe Abb. 4-47).

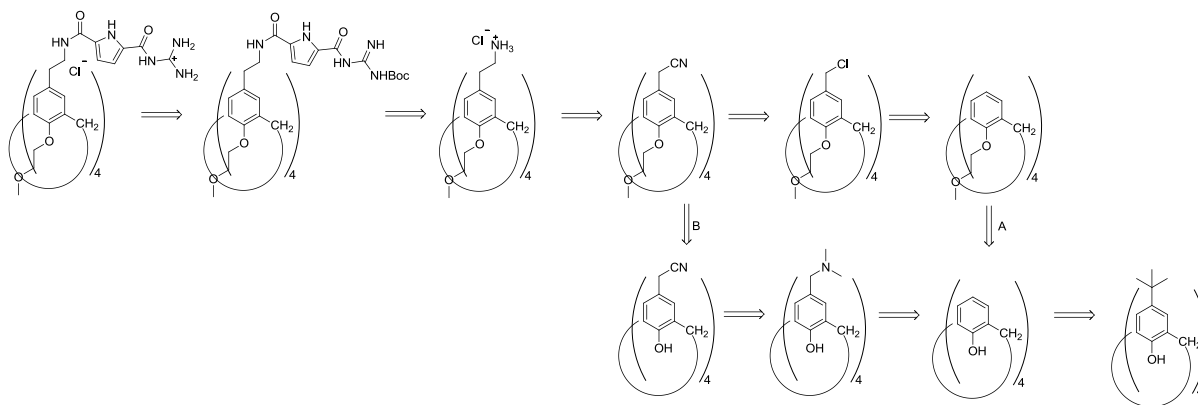


Abb. 4-47 Retrosynthetische Darstellung der beiden möglichen Wege A und B zur Synthese des gewünschten Produkts.

Die Veretherung mit 1-Brom-2-methoxyethan **81** und Natriumhydrid als Base verlief nicht vollständig und die jeweiligen Zwischenprodukte konnten im Rohprodukt massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Obwohl 8.00 Äquivalente in Bezug auf ein Calix[4]aren **54** eingesetzt wurden, waren auch nach sechs Stunden immer noch nur dreifach verethertes Substrat vorhanden, was jedoch säulenchromatographisch sehr gut getrennt werden konnte. Diese Zwischenprodukte lassen sich als gelbes Öl isolieren und in einem weiteren Ansatz zum gewünschten Produkt umsetzen. Auf diese Weise wurden im ersten Ansatz Ausbeuten von etwa 60 % erreicht. Durch Wiederholung des Ansatzes mit den Zwischenprodukten wurde insgesamt eine Ausbeute von ca. 70 % erreicht.

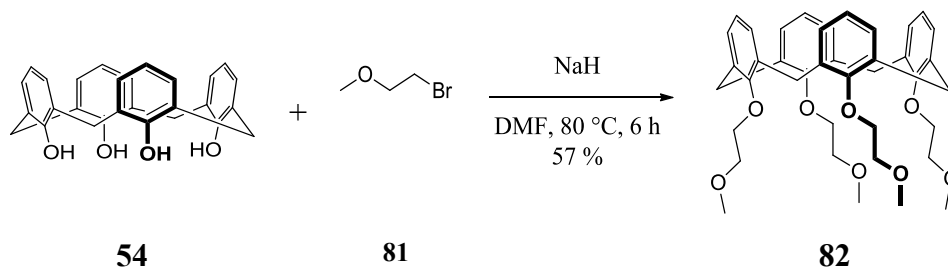


Abb. 4-48 Darstellung des 25,26,27,28-Tetra(methoxyethyl)-Calix[4]arens **82**.

Im nächsten Schritt wurde eine Chlormethylierung durchgeführt. Die Standardmethode zur Einführung einer Chlormethylgruppe war bisher der Einsatz von (Chlormethyl)methylether oder Bis(chlormethyl)ether unter *Friedel-Crafts*-Bedingungen in einer *Blanc*-Reaktion. Jedoch wurden diese Reagenzien nach der Gefahrstoffverordnung als krebserzeugend eingestuft. Alternative Vorgehensweisen zur Darstellung von Benzylchlorid wurden vorgeschlagen, wobei jedoch der Substitutionsgrad oft große Schwierigkeiten darstellt. *Itsuno et al.* beschrieben eine Methode zur Chlormethylierung von *cross-linked* Polystyrolen, die mit Trioxan und Chlortrimethylsilan in Anwesenheit von Zinkchlorid in Chloroform reagieren.<sup>120</sup> Dabei wird aktivierter Formaldehyd aus Trioxan und Zinnchlorid als *Lewis*-Säure gebildet.



Dieses reagiert mit Chlortrimethylsilan unter Bildung eines Trimethylsilylethers, des Chlorhydrins, welches strukturell dem (Chlormethyl)methylether ähnelt und als Chlormethylierungsreagenz agieren kann. Der Vorteil dieser Synthese ist, dass das Chlormethylierungsreagenz *in situ* entsteht und am Ende der Reaktion ein Überschuss durch den Hydrolyseprozess vernichtet wird.

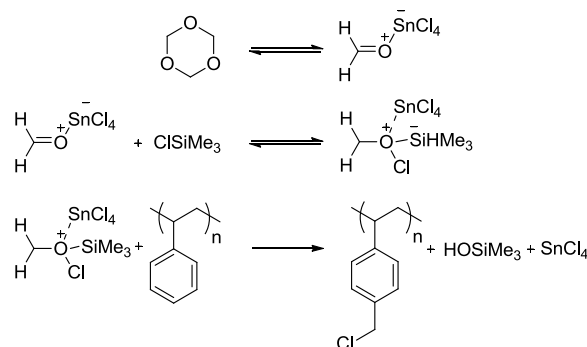


Abb. 4-49 Mechanismus der Chlormethylierung mit Trimethylchlorsilan.

Die Durchführung nach dieser Vorschrift lieferte eine Ausbeute von lediglich 9 %. Ein Nebenprodukt lieferte im  $^1\text{H}$ -NMR statt des erwarteten Singulets für die aromatischen Protonen viele unterschiedliche Signale, was für das Aufbrechen der *cone*-Konformation und der Bildung verschiedener Konformere spricht. Auch Edukt **82** und Calix[4]aren **54** wurden analytisch detektiert. Damit wurden anscheinend unter diesen Bedingungen die Ethergruppen wieder abgespalten. Daraufhin wurde die Reaktion bei noch niedrigen Temperaturen und kürzeren Reaktionszeiten durchgeführt, jedoch ohne Verbesserung. Der O-Methoxyethanrest scheint während einer Chlormethylierung mit Zinnchlorid nicht stabil genug zu sein.

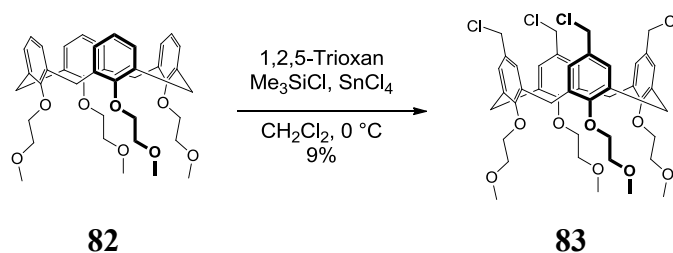


Abb. 4-50 Darstellung des 5,11,17,23-Tetra(chlormethyl)-25,26,27,28-Tetra(methoxyethyl)-Calix[4]arens **83**.

Um den Einfluss von Zinnchlorid ausschließen zu können, wurde eine Brommethylierung durchgeführt, welche im Arbeitskreis bereits bei Triethylbenzol zielführend war. Dazu wurde zu einer Lösung von **82** in 30 %iger Bromwasserstoffsäure in Essigsäure Paraformaldehyd und portionsweise Zinkbromid gegeben und erhitzt. Das isolierte Produkt zeigte zwar die erfolgreich substituierte Brommethylgruppe jedoch wurden dafür die Glycolgruppen abgespalten.

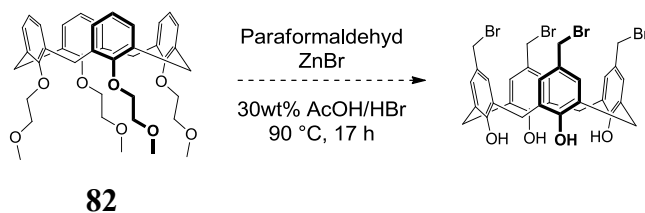


Abb. 4-51 Alternative Testreaktion für die Chlormethylierung unter Einsatz von Bromwasserstoffsäure.

Auch unter diesen Bedingungen ist der O-Methoxyethanrest nicht stabil genug. Die Synthese wurde schließlich nach Weg B versucht, bei dem man mit dem Tetra(cyanomethyl)-Calix[4]aren **62** als Edukt startet. Doch bereits der erste Schritt der Veretherung führte zu einem Produktgemisch, das durch die flexible Konformation des Calixarenes zustande kommt. Das Produkt konnte zwar massenspektrometrisch detektiert werden, jedoch findet man auch weitere Addukte, welche säulenchromatographisch nicht getrennt werden konnten. Somit musste auch dieser Weg aufgrund der Herausforderungen, welche die Calixarensynthesen mit sich bringen, verworfen werden.

Um die Schwierigkeiten, welche dieser Methoxyglycollinker mit sich brachte zu umgehen, wurde ein Alkyl linker zur Veretherung eingesetzt, welcher auch die erforderliche Lipophilie für einen Einsatz als Vektor für die Gentransfektion erbringen sollte. Die Darstellung des Zielmoleküls **90** verläuft damit entsprechend Abb. 4-52.

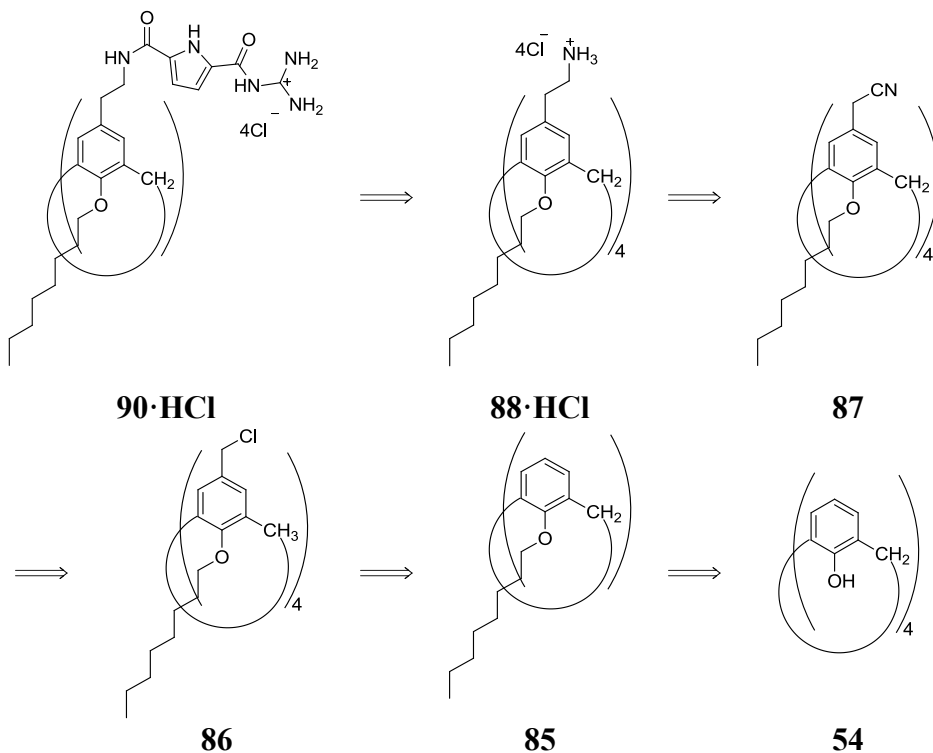


Abb. 4-52 Retrosynthetische Analyse der Synthese von 5,11,17,23-Tetrakis(GCP-2-aminoethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]aren-Hydrochlorid (**90·HCl**).

Zur Darstellung des Tetrakis(GCP-2-aminoethyl)-Calix[4]arens **90** wurde zunächst ausgehend von Calix[4]aren **54** eine Veretherung der Hydroxygruppen vorgenommen und damit die *cone*-Konformation fixiert. Dies wurde klassisch durch eine *Williamson*-Ethersynthese mit Natriumhydrid als Base und 1-Bromooctan in DMF bei 80 °C erreicht. Ein geringer Anteil an nicht vollständig O-alkylierten Zwischenprodukten kann chromatographisch abgetrennt und das Produkt als wachsartige kristalline Nadeln mit einer Ausbeute von 76 % erhalten werden.

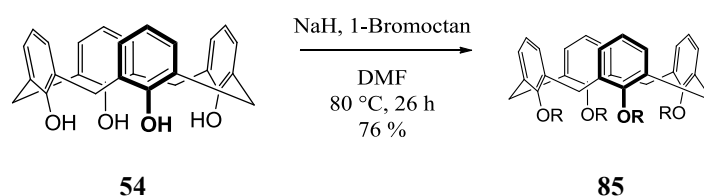


Abb. 4-53 Darstellung des 25,26,27,28-Tetraoktylether-Calix[4]arens (**85**).<sup>121</sup> R = Octylrest

Die anschließende Chlormethylierung wurde entsprechend vorheriger Versuche mit 1,2,5-Trioxan, Trimethylchlorsilan und Zinntetrachlorid als Katalysator in Dichlormethan angesetzt (siehe oben). Doch auch mit dem Octylether **85** war diese Reaktion nicht erfolgreich. Im <sup>1</sup>H-NMR wurde die Spaltung des Ethers nachgewiesen, indem die aliphatischen, nicht jedoch die aromatischen Resonanzen detektiert wurden. Vermutlich wurden die Aromaten unter diesen Bedingungen zersetzt und der Octylether als 1-Chlorooctan oder 1-Octen abgespalten. Der Einsatz der starken *Lewis*-Säure Zinn(IV)chlorid ist ebenfalls problematisch. Daher wurden hier im Rahmen einer Bachelorarbeit<sup>122</sup> die Reaktionsbedingungen und das Formylierungsreagenz variiert. Nur bei einer höheren Reaktionstemperatur von 0 °C konnte das gewünschte Produkt durch ESI-MS detektiert werden. Jedoch waren diese Bedingungen schließlich nicht geeignet für den Octylether **85**. Um den Einsatz der starken *Lewis*-Säure zu vermeiden, wurde die Synthese nach einer anderen Vorschrift mit Paraformaldehyd in Dioxan in einer Mischung aus konzentrierter Salzsäure, Eisessig und konz Salpetersäure bei 110 °C mit einer Ausbeuten von 66 % durchgeführt.<sup>123</sup>

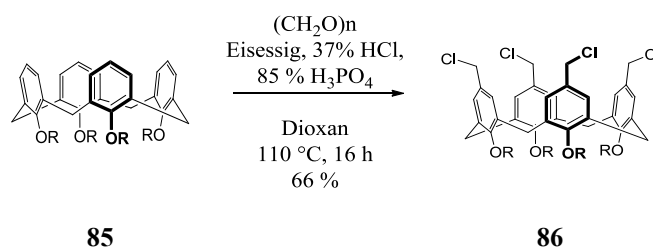


Abb. 4-54 Darstellung des 5,11,17,23-Tetra(chlormethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]arens **86**. R = Octylrest

Im folgenden Schritt wurde **86** mit Natriumcyanid in einer absolutierten DMSO/Dichlormethan-Mischung zu **87** umgesetzt. Das Rohprodukt zeigte im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum kaum noch Nebenprodukte. Ungewöhnlich ist hingegen die Intensität der Methylenprotonen, welche doppelt so hoch war wie erwartet und auch das Dublett war stark verbreitert. Die Ursache dafür wird in Lösemiteileinschlüssen vermutet. Nach der säulenchromatographischen Reinigung waren diese Effekte nicht mehr zu detektieren und das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 83 % isoliert werden. Diese Ausbeute wurde durch Variation des Lösemittels, der Äquivalente an Natriumcyanid und dem Einsatz von Methyljodid erreicht. Eine Optimierung durch Umkristallisation ist denkbar, so dass eine Säulenchromatographie nicht mehr notwendig wäre.

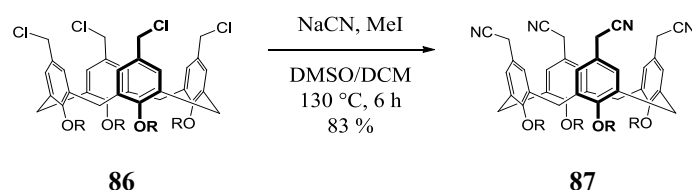


Abb. 4-55 Darstellung des 5,11,17,23-Tetra(cyanomethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]arens **87**.

$R = \text{Octylrest}$

Die anschließende Reduktion des Nitrils wurde mit einer 1 M Boran-Tetrahydrofuran-Komplex-Lösung in Tetrahydrofuran durchgeführt. Diese Reaktion verlief entsprechend dem Hydroxyhomolog **63** nahezu quantitativ und lieferte das Produkt durch eine Reinigung mit Hilfe der MPLC in hoher Reinheit als Chloridsalz. Mit diesem Amin **87** und Guanidiniumcarbonylpyrrol **48** wurde eine Kupplung mit HATU als Kupplungsreagenz und DIPEA als Base in absolutiertem DMF durchgeführt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur in einem Zeitraum von fünf Tagen mit einer Ausbeute von 83 %. Zum Schluss wurden noch die Boc-Schutzgruppen in Dichlormethan mit Trifluoressigsäure und Isopropylsilan abgespalten, das Rohprodukt chromatographisch an der MPLC gereinigt und nach Gefriertrocknung **90·HCl** mit einer Ausbeute von 48 % isoliert.

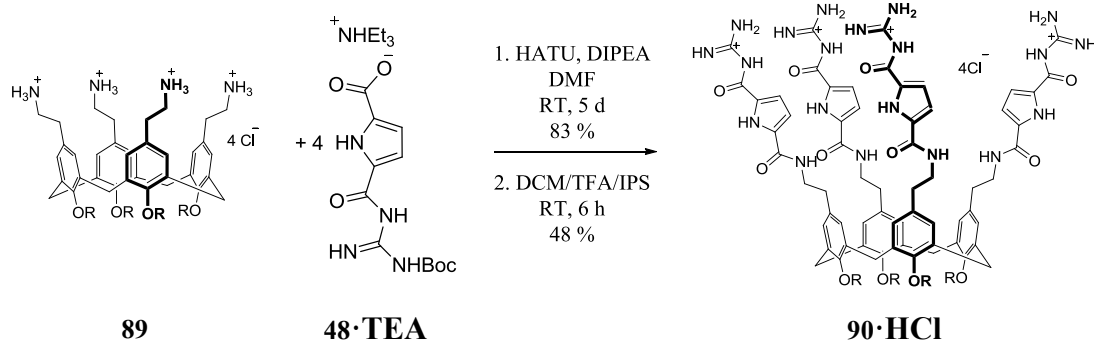


Abb. 4-56 Darstellung des 5,11,17,23-Tetrakis(GCP-2-Aminoethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]aren-hydrochlorids **90·HCl**.

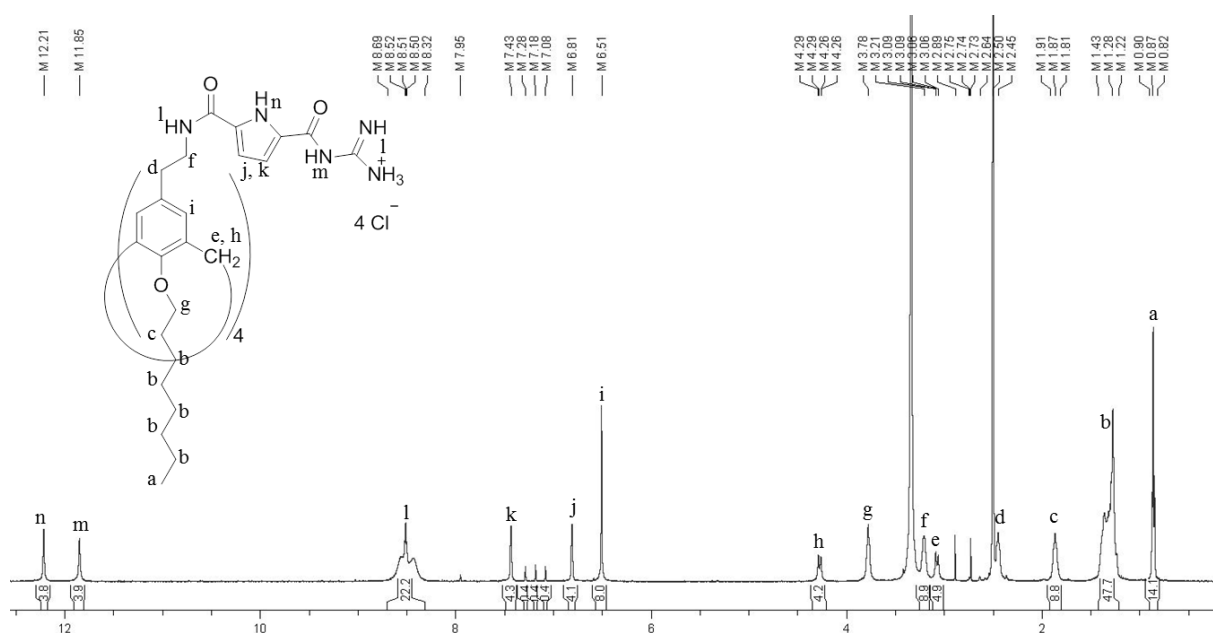


Abb. 4-57 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **90** bei 25 °C. Lösemittelpeaks durch DMF-Spuren enthalten.

Das  $^1\text{H}$ -NMR zeigt in Abb. 4-57 im aromatischen Bereich drei Signale, welche nicht genau zugeordnet werden konnten. Bei einer Messung bei 100 °C werden diese Signale nicht mehr detektiert, weshalb von einer geringen Variation der symmetrischen *cone*-Konformation ausgegangen wird (siehe Abb. 4-58).

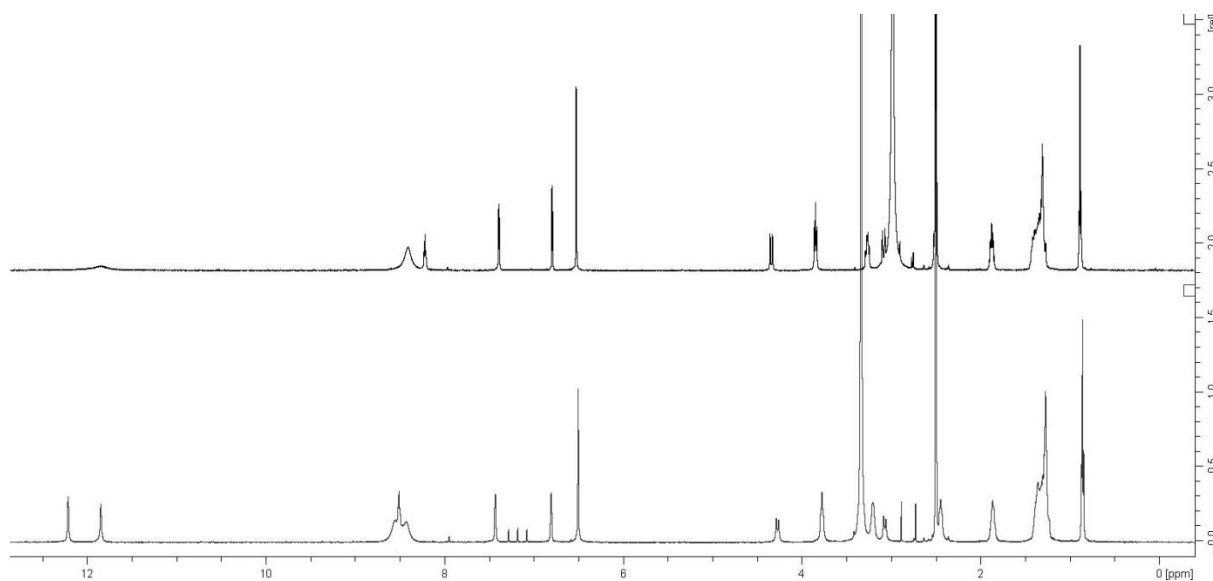


Abb. 4-58 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **90** bei 25 °C (unten) und bei 100 °C (oben).

Mit der erfolgreichen Synthese des amphiphilen Moleküls **90** lag nun eine Verbindung vor, welche wie auch das Hydroxyanalog **65** vier GCP-Liganden an einem aromatischen Calix[4]aren in der *cone*-Konformation vorweist, welche jedoch zusätzlich lipophile Reste enthält. Als nächstes solle der  $\text{pK}_\text{s}$ -Wert bestimmt werden, da die Versuche zur Gentransfektion bevorzugt bei physiologischem pH durchgeführt werden. Aufgrund des deutlich amphiphilen Charakters von **90** sollte zudem die Konzentration bestimmt werden, bei welcher von einer Aggregation

auszugehen ist. Im folgenden Abschnitt werden hierzu DPH-, DLS und AFM-Messungen gezeigt, mit denen die Bestimmung der Kritischen Mizellenkonzentration durchgeführt werden sollte.

#### 4.2.2 Eigenschaften des Amphiphils **90**

Die  $pK_s$ -Werte für **90** liegt auch hier in einem leicht sauren pH-Bereich. Zu beobachten war hier jedoch, dass eine fortschreitende Deprotonierung zu einem Niederschlag ab etwa pH 6 führte.

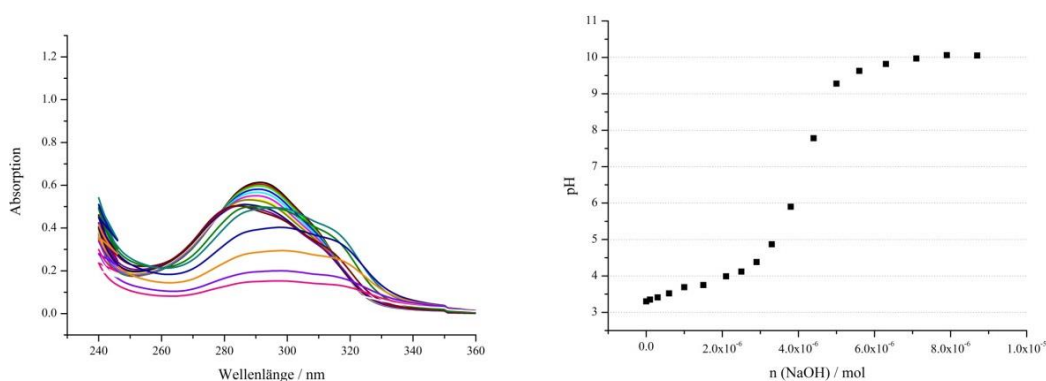


Abb. 4-59 Titration von **90** (10  $\mu$ M in H<sub>2</sub>O/1 % DMSO) unter Verfolgung der pH-Werte (rechts) und Aufnahme der zugehörigen UV-Spektren (links).

Eine Analyse mit Hilfe von *SpecFit* lieferte für **90** einen  $pK_s$ -Werte von  $5.95 \pm 0.628$  (siehe Abb. 4-28). Damit ist dieser etwas höher als der für Rezeptor **65** mit 5.64, wodurch unter physiologischen Bedingungen im Vergleich mehr protonierte Guanidinio-Funktionen vorliegen.

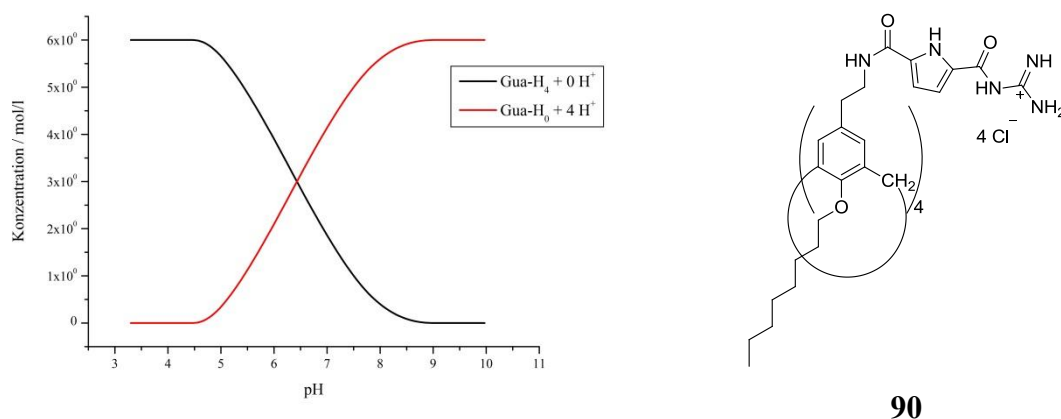


Abb. 4-60 Von *Specfit* ermittelte Konzentrationen in Abhängigkeit vom pH-Wert:  $pK_s(\mathbf{90}) = 5.95 \pm 0.63$ .

Die anschließenden DPH-Messungen wurden entsprechend Kap. 4.1.2 durchgeführt.<sup>112</sup> Das Amphiphil **90** wurde bei diesem Fluoreszenzassay mit variierender Konzentration (1-10  $\mu\text{M}$ /l) zu einer 1  $\mu\text{M}$  Lösung des DPH **66** gegeben und diese Mischung mehrere Stunden mit Hilfe eines Peptidschüttlers geschwenkt. Zur Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des Amphiphils nach 4 h, 17 h und 21 h aufgetragen (Abb. 4-61).

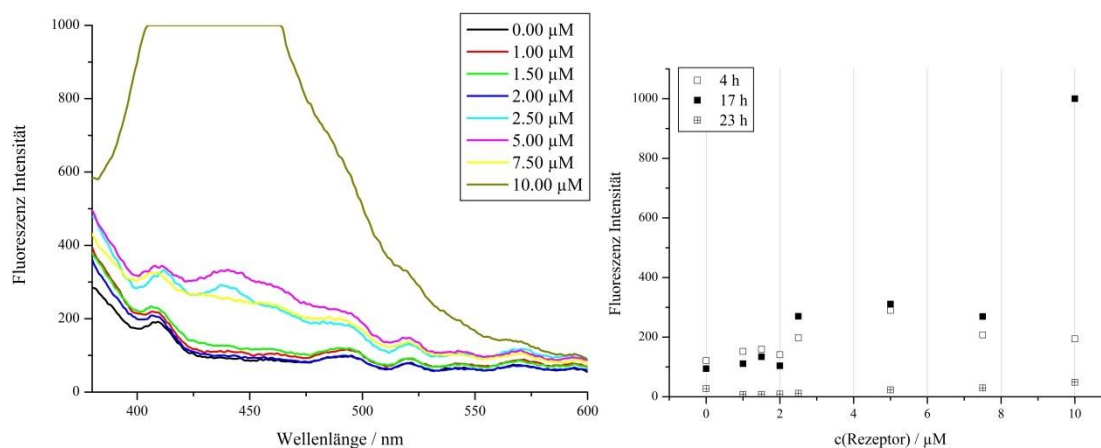
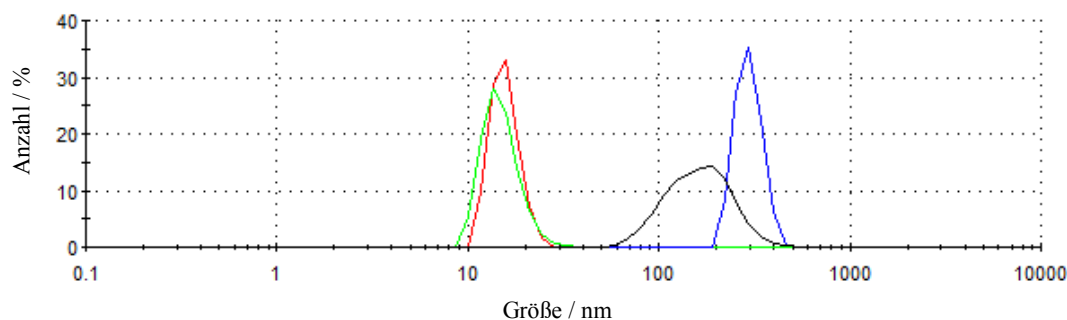


Abb. 4-61 links: Fluoreszenzspektren bei zunehmendem Anteil des Amphiphilen **90**. rechts: Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des Amphiphilen **90** bei 470 nm.

Wie man in Abb. 4-61 sieht, verändert sich die Fluoreszenz des DPH **66** sowohl konzentrationsabhängig als auch zeitabhängig. Man sieht, dass nach vier Stunden nur ein geringfügiger Anstieg der Fluoreszenz stattfindet und dieser mit 2.5  $\mu\text{M}$  zu einem geringen Anstieg führt, welcher aber auch für höhere Konzentrationen konstant bleibt. Betrachtet man aber die Intensitäten nach 17 h fällt ein deutlicher Anstieg zwischen 7.5 und 10  $\mu\text{M}$  auf. Nach 21 h jedoch sind diese Aggregate nicht mehr stabil und fallen aus. Eine Fluoreszenz ist dann nicht mehr zu bestimmen. Diese Messungen erlauben noch keine exakte quantitative Bestimmung der kritischen Mizellenkonzentration, jedoch erhält man erste Hinweise, dass mizellenartige Strukturen ab einer Konzentration zwischen 7.5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  ausgebildet werden. Zur Veranschaulichung der aggregierten Strukturen wurden DLS-Messungen derselben Proben durchgeführt. Dabei schränkt das Vorhandensein von ungelösten DPH-Partikeln **66** die Messungen deutlich ein. Dies zeigt sich v. a. anhand von hohen PDI-Werten.



Kurve	c ( <b>90</b> ) / $\mu\text{M}$	Volumenstreuverh. / nm (%) , Peakbreite / nm	Anzahlstreuverh. / nm (%) , Peakbreite / nm	Durchschnitt / nm	PDI
schwarz	0.0	225.9 (82.3), 99.9 5072 (11.9), 943 1394 (5.7), 328	171.9, 68.2	299.5	0.413
blau	2.00	356.8 (63.0), 123 100.6 (37.0), 29.9	90.07, 46.3	487.2	0.566
rot	7.5	1093 (17.5), 215 16.74 (81.2), 3.15 68.02 (1.3), 12.2	15.71, 2.75	1112	0.995
grün	10.0	199.2 (1.2), 70.3 17.27 (98.8), 4.62	15.3, 3.43	243.7	0.356

Abb. 4-62 DLS-Messung von DPH **66** ( $1 \mu\text{M}$ ) mit variierenden Anteilen Rezeptor **90** in Tris-Puffer ( $\text{pH } 6.0$ ,  $0.01 \text{ M}$ ,  $1.1 \%$  DMSO). Die Größe der Strukturen ist über den Durchmesser in nm angegeben.

Abb. 4-62 zeigt deutlich, dass DPH **66** ohne das Vorhandensein eines Amphiphiles zu sehr großen Partikeln führt, wobei die Messungen hier über mehrere Bestimmungen gemittelt wurden. Die Zugabe des Amphiphiles führt ab  $2 \mu\text{M}$  zu einer Verbesserung der Messgenauigkeit und ab  $7.5 \mu\text{M}$  sieht man eine deutliche Verkleinerung der Partikel. Mit  $10 \mu\text{M}$  und damit einem zehnfachen Überschuss an **90** zeigt die Messung sehr definierte kleine Partikel an. Dabei entspricht die gemessene Größenordnung von  $15 \text{ nm}$  in etwa der Größe eines Vesikels für das Octylcalixaren **90**, welches eine Länge von  $2.78 \text{ nm}$  aufweist.

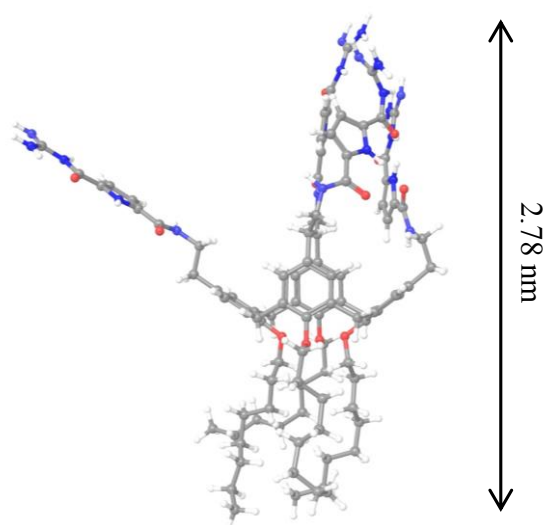


Abb. 4-63 Ergebnis der Konformationsanalyse von **90** mit OPLS\_2005\* mit Wasser als Kontinuum-Lösemittel und gemessene Distanzen in nm.



Diese Beobachtungen konnten anhand von AFM-Messungen unterstützt werden. Hier wurden aufgrund der Messgenauigkeit höhere Konzentrationen eingesetzt. Ausgehend von einer 0.1 mM DMSO-Lösung zeigt das Amphiphil **90** die Bildung einer flächendeckenden Schicht aus Aggregaten mit einer Höhe von 0.29 nm und einer mittleren Breite von 19 nm. Diese Breite entspricht etwa dem hydrodynamischen Radius, welcher mittels DLS bestimmt wurde und würde etwa in der Größenordnung eines Vesikels liegen. Die Wechselwirkung der AFM-Spitze mit der Oberfläche wird neben der Oberflächentopologie auch durch weitere Probeneigenschaften wie Härte, Elastizität und Oberflächenhaftung bestimmt, was die Aufnahme eines Phasenbildes erlaubt. Im Phasenbild sind die flächendeckenden Strukturen noch deutlicher zu erkennen (siehe Abb. 4-64 Mitte).

Zudem sind auch noch größere Aggregate sichtbar, bei denen es sich vermutlich um größere und festere sphärische Aggregate handelt. Diese weisen alle eine Höhe von etwa 1.7 nm und eine mittlere Breite von 153 nm auf. Bei einer weiteren Vergrößerung dieser Aggregate findet man im Phasenbild helle Flächen mit einem dunklen Rand, was eher untypisch für ein Vesikel ist. In diesen großen Aggregaten ist daher wahrscheinlich kaum Lösemittel eingeschlossen.

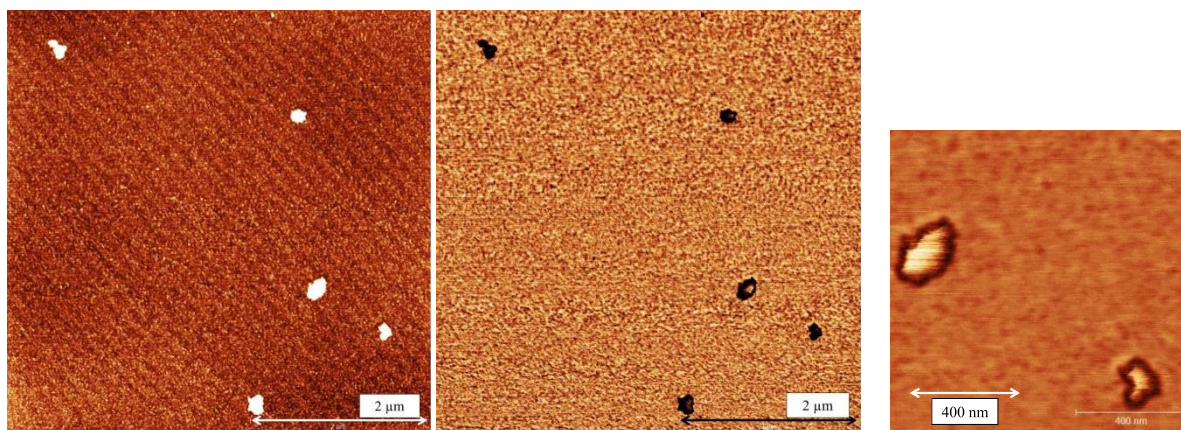
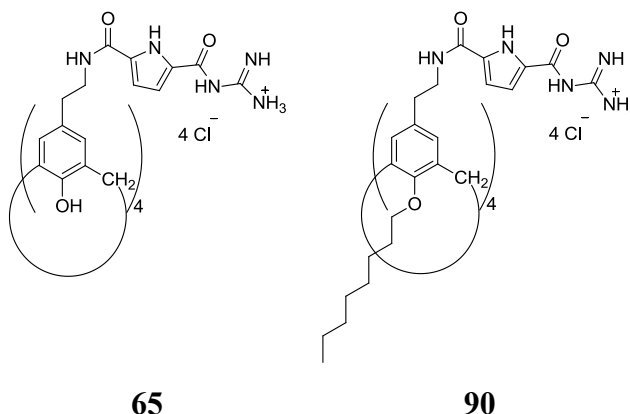


Abb. 4-64 Abb. 4-65 oben : AFM-Höhenprofil von **90** mit je zugehörigem Phasenbild und weiterer Zoom des Phasenbilds.

Diese Messungen zeigten, dass der Rezeptor **90** amphiphile Eigenschaften aufweist und in einem Konzentrationsbereich zwischen 7.5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  in wässriger Lösung Mizellen bzw. sogar Vesikel ausbildet.

### 4.2.3 Gentransfektion

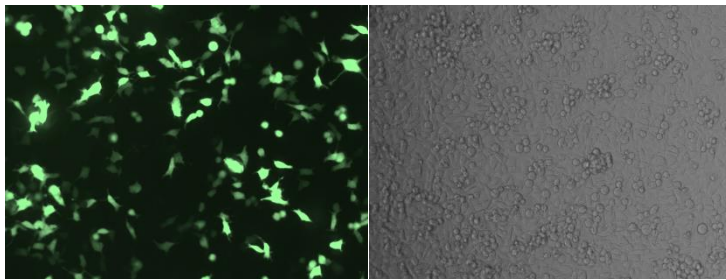
Mit dem amphiphilen Rezeptor **90** liegt ein System vor, welches in Anlehnung an Ungaros Arbeiten auf sein Potential als nicht-viraler Vektor untersucht werden kann. **65** wurde vergleichsweise als weniger lipophiler Vektor eingesetzt. Im Vergleich zu den bekannten Guanidiniumcalixarenen (siehe Kap. 2.5) bieten die GCP-Einheiten mit ihrer



Guanidinio-Funktion einen geringeren  $pK_s$ -Wert und damit die Möglichkeit, im Endosom protoniert zu werden. Beide Rezeptoren **65** und **90** haben demnach die Fähigkeit als Protonenschwamm zu agieren und somit möglicherweise die Freisetzung aus dem Endosom („*endosomal escape*“) zu ermöglichen (siehe dazu auch S.29). Das Calix[4]aren führt durch seine *cone*-Konformation zu einer Präorganisation der kationischen Substituenten, welche mit dem DNA-Rückgrat interagieren sollen. Es ist bekannt, dass durch die lipophilen Ketten eine Transfektion begünstigt wird, da die amphiphilen Eigenschaften zu einer erleichterten Kondensation mit der DNA führen können. Die Transfektionsmessungen wurden von Franziska V. Dietrich im Rahmen ihrer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Knauer am Institut für Biologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Dafür wurden humane Epithelzellen des epidermoiden Karzinoms, die A431-Zellen, eingesetzt und diese unter Verwendung von markierter Plasmid-DNA (pCDNA3-GFP) transfiziert. Die Substanzen **65** und **90** wurden in einer Konzentration von 5, 15 und 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Kontrollsubstanz diente Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000, welches durch lipide Einheiten in wässriger Lösung Liposome ausbildet und durch seine Eigenschaften momentan eines der führenden Transfektionsreagenzien ist.

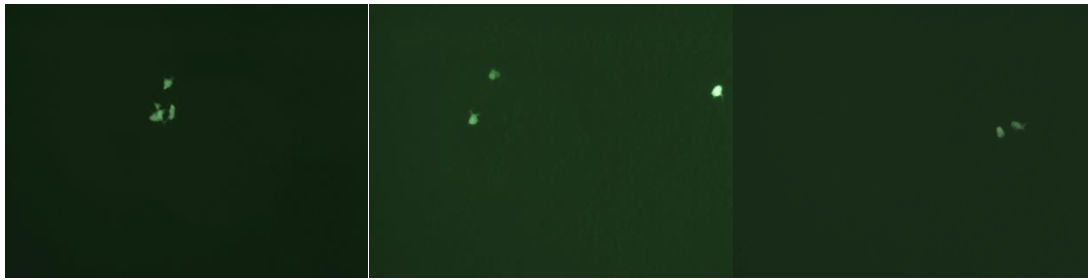
Für beide Substanzen konnte die Expressierung eines *Green Fluorescent Protein* (GFP) mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden (siehe Abb. 4-66). Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurden die fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zu den unveränderten Zellen ausgezählt und die mittlere Transfektionseffizienz aus drei verschiedenen Messungen bestimmt.

## Lipofectamin™ 2000

Konzentration (**65**) = 5 mM,

15 mM,

25 mM

Konzentration (**90**) = 5 mM,

15 mM,

25 mM

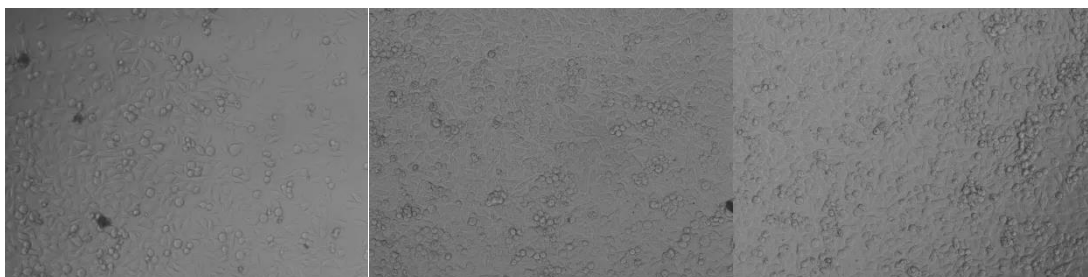
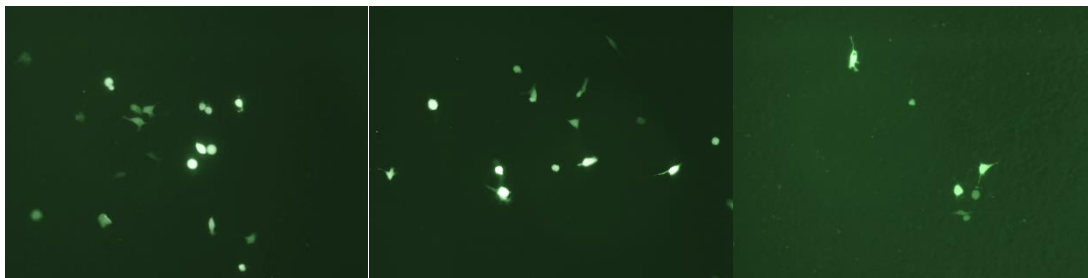


Abb. 4-66 Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transfizierten Zellen.

Die Transfektionseffizienz von Lipofectamin betrug  $12.4 \% \pm 2.3 \%$ . Die höchste Transfektionseffizienz für **65** wurde mit  $0.11 \%$  bei einer Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  erreicht, wobei zu berücksichtigen ist, dass hier auch Aufnahmen ohne transfizierte Zellen gefunden wurden. **90** dagegen zeigt eine deutlichere Transfektion mit  $1.80 \%$  bei  $25 \mu\text{M}$  (siehe Abb.

4-67). In dem gemessenen Konzentrationsbereich nimmt die Effizienz mit zunehmender Konzentration ebenfalls zu und erreicht ein Maximum bei 25  $\mu\text{M}$ .

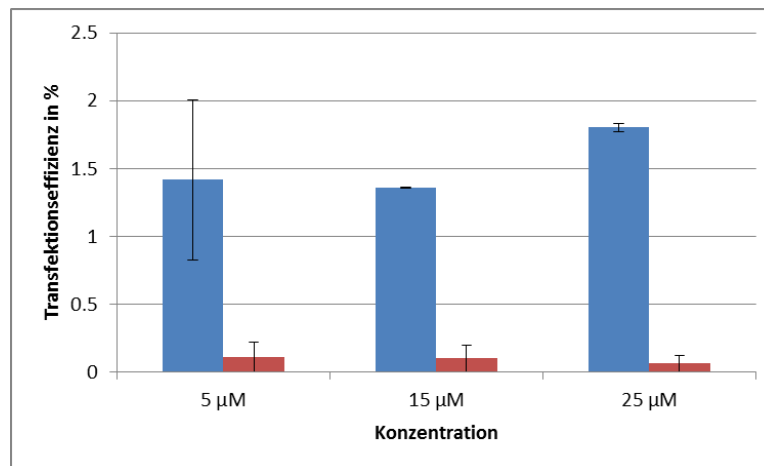


Abb. 4-67 Darstellung der mittleren Transfektionseffizienz aus drei Auszählungen unter Angabe der Standardabweichung von rot: **65** und blau: **90**.

Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde in weiteren Versuchen sowohl mit den Zelllinien HeLa als auch HeLa Kyoto gearbeitet und unterschiedliche Transfektionsprotokolle angewandt. Die eingesetzte Substanzkonzentration blieb dabei konstant bei 15  $\mu\text{M}$ . HeLa-Zellen traten bei geringer Zelldichte meist ohne Kontakt zu anderen Zellen auf, wohingegen HeLa Kyoto-Zellen ein Wachstum innerhalb von Zellverbänden bevorzugten. HeLa Kyoto-Zellen waren besser transfizierbar als HeLa-Zellen. Auch die verwendete Menge an DNA nahm Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Es wurde beobachtet, dass bei der Verwendung von 300 ng DNA im Vergleich zu 50 ng Niederschläge gebildet wurden, welche die DNA-Aufnahme einschränkten.

Außerdem wurden unterschiedliche standardisierte Nährmedien für die Zellkultur auf Basis des *Eagle's Medium*, darunter DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) und Opti-MEM® (Modifikation des *Modified Eagle's Medium*) eingesetzt. Unterschiede in Bezug auf die Transfektionseffizienz zwischen der Verwendung von Opti-MEM® oder DMEM waren marginal. Möglicherweise führte der Einsatz von Opti-MEM® zu leicht verbesserten Ergebnissen. Im Gegensatz zu den in Abb. 4-67 dargestellten unterschiedlichen Transfektionseffizienzen zwischen **65** und **90** war in diesem Optimierungsversuch keine der beiden Substanzen im Hinblick auf die Transfektionseffizienz als eindeutig besser oder schlechter zu bewerten. Wiederholungen des Versuchs, bei denen die Transfektion mittels Opti-MEM® und der Verwendung von 50 ng DNA erfolgte, ließen ebenfalls keine entsprechende Tendenz erkennen. Hier spielen vermutlich die unterschiedlichen Löslichkeiten von **65** und **90** eine entscheidende Rolle.

Diese Optimierungsversuche haben gezeigt, wie empfindlich die Transfektionseffizienz auf die äußeren Bedingungen reagiert.

Betrachtet man die ersten Versuchsbedingungen zeigte das amphiphile Calix[4]aren **90** seine Fähigkeit als nicht-viraler Vektor, wobei natürlich seine Effizienz noch gesteigert werden könnte. Ein möglicher Ansatzpunkt stellt die eingeschränkte Löslichkeit des Substrats **90** unter physiologischen Bedingungen dar. Der Anteil an DMSO variierte zwischen 0.05 % und 0.25 % und sollte daher nicht toxisch für die Zelle sein.

Ein Vergleich mit *Ungaros* Guanidiniumcalixarenen mit Octylether am *lower rim* zeigt einen ähnlichen Konzentrationsbereich für eine erfolgreiche Gentransfektion ohne Zugabe des Helferlipides DOPE bei 20  $\mu$ M. Dagegen konnten die Guanidiniocarbonylpyrrolcalixarene sogar bei 5  $\mu$ M noch transfizieren.

Die Effizienz ist quantitativ schwer zu vergleichen, da die Versuchsbedingungen voneinander abweichen und bei *Ungaro* für seine Optimierungen eine Mischung aus Rezeptor und Helferlipid DOPE eingesetzt wurde.

Mit **90** wurde damit ein amphiphiles Calix[4]aren mit dem Guanidiniocarbonylpyrroliganden fixiert über Octylketten in der *cone*-Konformation synthetisiert, welches das GFP erfolgreich ohne Helferlipid transfizieren kann.

#### 4.2.4 Strukturanalyse der gebildeten Aggregate von **90** mit ctDNA mittels Rasterkraftmikroskopie

Die erfolgreiche Gentransfektion weist auf Aggregatbildung zwischen dem lipophilen Calixa[4]aren **90** und DNA hin. Mithilfe der Rasterkraftmikroskopie sollten diese Aggregate sichtbar gemacht werden. Hier wird ausgenutzt, dass DNA Moleküle, welche auf eine Mica-Oberfläche gebracht werden, in der Lage sind, sich auf der Oberfläche trotz des Übergangs von zwei zu nur noch zwei Dimensionen so zu verteilen, dass ihre ursprüngliche Konformation bleibt erhalten.<sup>124</sup> Mica weist eine negative Oberflächenladung auf, weshalb eine wässrige Magnesiumchloridlösung (0.26 mM) als Lösemittel gewählt wurde. Dies sollte die Verteilung der negativ geladenen DNA auf der negativ geladenen Oberfläche erlauben und zudem verhindern, dass beobachtete Effekt durch bloße Ladungsänderung durch die Zugabe der kationischen Rezeptoren stattfinden. Entgegen den Transfektionsmessungen mit Plasmid-DNA (pCDNA3-GFP) wurden die AFM-Messungen mit ctDNA durchgeführt. Die

ctDNA wurde von *Sigma-Aldrich* bezogen, in wässriger Lösung aufgenommen und mit Ultraschall behandelt.

ctDNA wurde in wässriger Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt. Der Rezeptor **90** wurde aus einer 1 mM DMSO Stammlösung genommen und mit wässriger Magnesiumchloridlösung (0.26 mM) auf eine Konzentration von 37.5  $\mu$ M mit einem DMSO Anteil von 3.75 % verdünnt. Die beiden Komponenten wurden im jeweiligen Verhältnis von Rezeptor zu ctDNA von 0.3, 0.2 und 0.15 zusammengegeben und gut durchmischt. Nach einer Minute wurden 10  $\mu$ l dieser Lösung auf einen Drehteller zur Rotationsbeschleunigung aufgetragen und 1 min bei 20 Umdrehungen/min und weiteren 2 min bei 100 Umdrehungen/min behandelt. Durch Variation der Drehgeschwindigkeit wird gewährleistet, dass sich eine ausreichende Menge der zu untersuchenden Substanz auf der Oberfläche verteilt, jedoch keinerlei Flüssigkeitstropfen zurückbleiben. Das Abtasten der Probe im Kontaktmodus wurde jeweils an mehreren Stellen auf einer Oberfläche durchgeführt, um evtl. Artefakte ausschließen zu können. Die einzelnen Komponenten wurden zur Kontrolle jeweils isoliert voneinander unter den entsprechenden Messbedingungen vermessen. Die Mica-Oberfläche wurde jeweils frisch abgezogen und die Messungen mit einer Abtastgeschwindigkeit von 5-10  $\mu$ M/s durchgeführt.

Zum Vergleich wurde ctDNA in wässriger Magnesiumchloridlösung unter denselben Bedingungen ohne Zugabe des Rezeptors betrachtet. Sie besteht aus einer polymeren Mischung aus Einzel- und Doppelsträngen, wobei der Anteil der Doppelstränge überwiegt. Dies zeigt sich auch bei den AFM-Messungen unter den oben beschriebenen Bedingungen. Wie in Abb. 4-68 zu sehen, finden sich sowohl strangartige verzweigte Strukturen als auch kondensierte Aggregate. Die Höhen für die linearen Strukturen variieren zwischen 0.18 nm und 0.65 nm mit einer Breite von etwa 30.8 nm 47.4 und. Die unsymmetrisch kondensierten Strukturen setzen sich laut Höhenprofil aus mehreren Strängen zusammen. Hier kann man Höhen von 1.04 nm und eine Breite von 81.4 nm messen. Diese Größenordnungen weisen sowohl auf Doppelstränge als auch auf Aggregate hin und sind vergleichbar mit Literaturwerten, die für die Höhe eines Doppelstrangs mit  $0.55 \pm 0.15$  nm und einer Breite von  $12 \pm 3$  nm bestimmt wurden.<sup>124</sup>



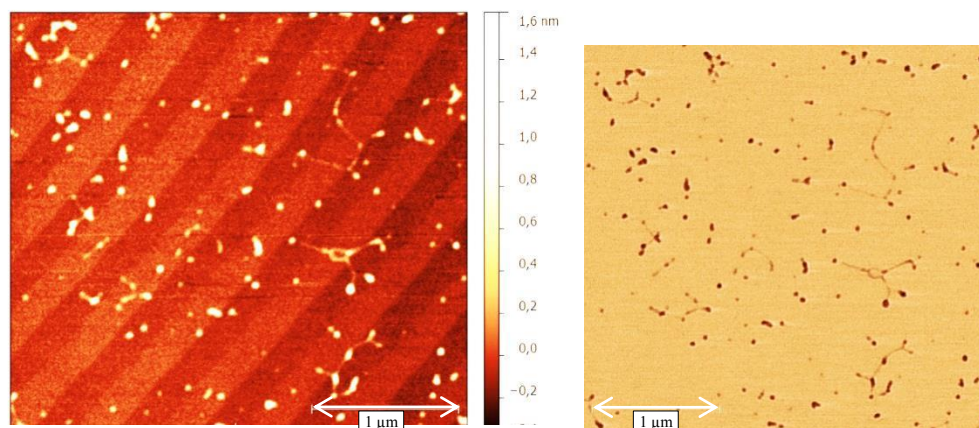


Abb. 4-68 AFM-Höhenprofil von ctDNA (5 µg/ml), MgCl<sub>2</sub> (0.26 mM); Höhenprofilbild 1 µm und zugehöriges Phasenbild. Man sieht sowohl strangartige verzweigte Strukturen als auch kompaktere kondensierte Aggregate. Die hochsymmetrischen Strukturen können MgCl<sub>2</sub> zugeordnet werden.

Zur Untersuchung der Aggregatbildung mit dem lipophilen Calixa[4]aren **90** wurden Lösungen in einem Verhältnis von Rezeptor zu den ctDNA-Phosphatgruppen von 0.3, 0.2 und 0.15 vermessen. Dabei erwiesen sich 0.3 Äquivalente an Rezeptor **90** als ungeeignet für diese Messbedingungen. Auf der Oberfläche waren nur einzelne kugelsymmetrische Partikel, welche dem Magnesiumchlorid zugeordnet werden konnten, jedoch keine Aggregate sichtbar. Auch die ctDNA-Stränge waren nicht mehr detektierbar, woraus sich schließen lässt, dass eventuell gebildete Aggregate so groß sind, dass sie sich nicht für eine Rotationsbeschichtung eignen. Es wird vermutet, dass Ladungsänderungen die Anhaftung auf der Oberfläche erschweren. Bei einem Verhältnis von 0.2 Äquivalenten Rezeptor zu ctDNA erhält man großflächige sehr flache Strukturen mit einem Durchmesser von etwa  $2.60 \mu\text{M} \pm 0.25$  (s. Abb. 4-69). Die Höhe entspricht mit 0.28 nm den einzelnen DNA Strängen. Betrachtet man das Phasenbild zeigt sich, dass die Fläche nicht vollständig geschlossen vorliegt, sondern dass Hohlräume enthalten sind. Dies könnte darauf hinweisen, dass einzelne Bereiche durch die lipophilen Reste gegeneinander abgegrenzt sind. Gebildete Aggregate scheinen durch die Rotationsbeschichtung sehr großflächig verteilt worden zu sein, was schließlich zu sehr geringen Höhen führte.

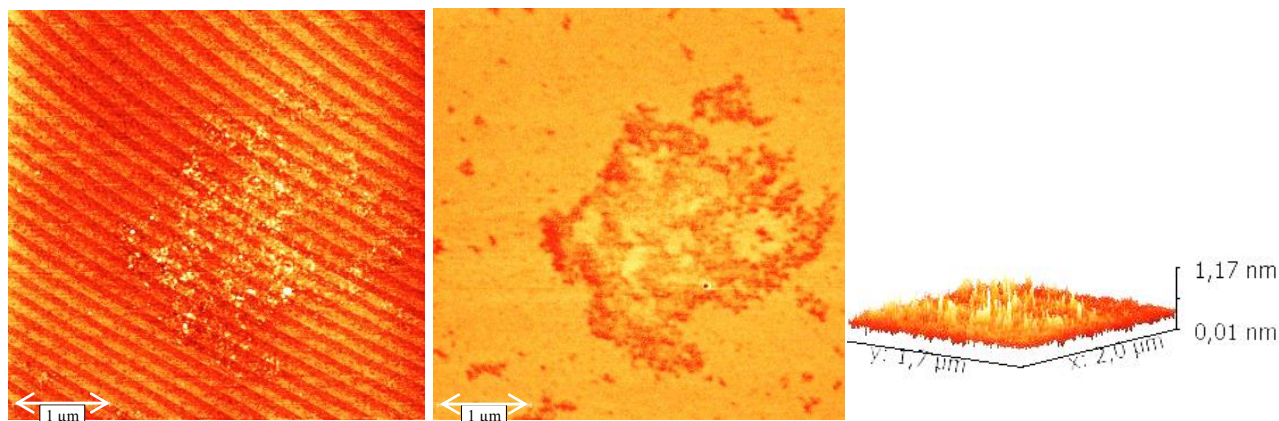


Abb. 4-69 AFM-Höhenprofil und -Phasen von ctDNA (5 µg/ml),  $\text{MgCl}_2$  (0.26 mM) und 0.2 Äq. **90**; Es bildet sich eine großflächige sehr flache Strukturen mit einem Durchmesser von etwa  $2.60 \mu\text{M} \pm 0.246$  aus.

Eine weitere Reduktion des Anteils an Calixa[4]aren **90** auf 0.15 Äquivalente führte zu einer Detektion von kleineren und höheren Aggregaten. In Abb. 4-70 sieht man netzartige Strukturen mit einer Höhe von 0.38 nm bis 0.76 und damit höher als die Doppelstränge. Das Höhenprofil zeigt zusammenhängende Stränge an. Neben diesen Strukturen finden sich ebenfalls kompaktere unsymmetrische Strukturen mit vergleichbaren Ausmaßen. Interessant ist die mit 1 markierte Struktur bei der sich eine Aggregation andeutet, jedoch noch ein freier Strang sichtbar ist.

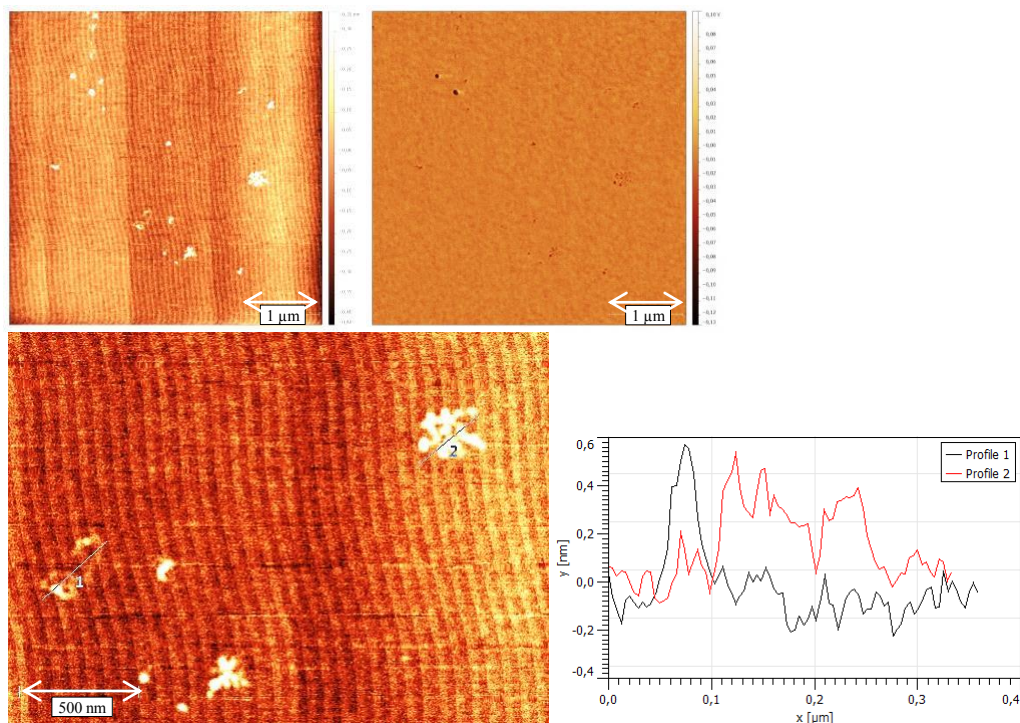


Abb. 4-70 AFM-Höhenprofil und -Phasen von ctDNA (5 µg/ml),  $\text{MgCl}_2$  (0.26 mM) und 0.15 Äq. **90**.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AFM-Messungen die Ausbildung von Aggregaten zeigen konnten. Dabei war eine hohe Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten wobei vermutet wird, dass bei einer höheren Calixarenkonzentration Aggregate ausgebildet



werden, mit denen eine Probenvorbereitung über eine Rotationsbeschleunigung nicht geeignet ist. Mit einer Zusammensetzung Rezeptor zu ctDNA von 0.2 und 0.15 waren Aggregate sichtbar, eine genau Strukturaufklärung mit diesen Messungen jedoch noch nicht realisierbar.

### 4.3 BESTIMMUNG DER WECHSELWIRKUNG VON ctDNA MIT DEN REZEPTOREN 65 UND 90

Da nun Rezeptor 65 mit Nucleotiden sehr stabile Komplexe ausbildet und der lipophilere Rezeptor 90 sich als geeigneter Vektor für die Gentransfektion gezeigt hat, wurden die beiden Verbindungen auf ihre Bindungseigenschaften mit ctDNA untersucht. Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Methoden wie die Thermische Denaturierung, ein Ethidiumbromid-Verdrängungsassay und eine Bestimmung mittels ITC vorgestellt.

#### 4.3.1 Bestimmung von DNA-Wechselwirkungen mittels Thermischer Denaturierung

Durch die Messung der UV-Absorption bei 260 nm ist es möglich den thermischen Denaturierungsvorgang der DNA zu verfolgen und eine charakteristische Denaturierungstemperatur („Schmelztemperatur“)  $T_m$  zu bestimmen. Findet eine Wechselwirkung der DNA mit einem Rezeptor statt, kann es zur Veränderung von  $T_m$  kommen. Es handelt sich damit um eine schnelle Methode, um erste Hinweise auf vorhandene Wechselwirkungen mit DNA-Molekülen zu bekommen.

Zur Durchführung einer thermischen Denaturierung wurden Verhältnisse von Rezeptor zu ctDNA von 0.1 bis 0.3 Äquivalente in einer Küvette eingestellt. Diese Lösungen wurden von 25 °C auf 99 °C mit einer Geschwindigkeit von 1 °C pro Minute erhitzt und die Absorption bei 260 nm aufgenommen. Die Ergebnisse wurden auf zwei verschiedene Arten ausgewertet und jede Messung mindestens zweimal wiederholt. Zum einen die Bestimmung unter Auftragung der Temperatur gegen die erste Ableitung der gemessenen Absorption, wobei mit Hilfe von *Origin* das Maximum, welches den Wendepunkt darstellt, bestimmt wurde. Als Kontrolle wurde auch eine grafische Methode verwendet. Hierbei wurden an die gerade verlaufenden Enden der Schmelzkurven Asymptoten angelegt. Eine dritte Gerade wird so in den steilen Anstieg der Schmelzkurve gelegt, dass möglichst viele Punkte auf ihr zu liegen kommen. Der Mittelwert der Schnittpunkte dieser Geraden mit den beiden Asymptoten ergibt den gesuchten Wendepunkt.

Vor Durchführung der Denaturierung muss zunächst sichergestellt werden, dass die Rezeptoren eine solche Erhöhung der Temperatur unverändert bestehen können. Es muss also geprüft werden, ob die UV/Vis-Absorption der Rezeptoren sich mit der Temperatur ändert. Es

wurden die Emissionsspektren von **65** (52.6  $\mu\text{M}$ ) in Cacodylatpuffer (0.01 M, 5 % DMSO) bei pH 5 und 7 aufgenommen. Die Probe wurde angesetzt und das Emissionsspektrum gemessen, danach wurde dieselbe Probe entsprechend der späteren Denaturierungsmessung erhitzt und nach Abkühlung auf 25 °C ein zweites Spektrum aufgenommen. Diese Probe wurde über Nacht gelagert und ein drittes Spektrum aufgenommen, um eine Veränderung nach längerer Zeit zu prüfen.

Wie in Abb. 4-71 zu sehen, gibt es für **65** dabei pH-abhängige Unterschiede. Für eine Messung bei pH 5.0 war keine Änderung des Absorptionsspektrums der Verbindung **65** und damit seine Stabilität gegeben. Bei pH 7.0 dagegen erfolgte nach einer Erwärmung auf 99 °C eine deutliche Abnahme der Absorption, wobei diese im betrachteten Bereich bei 260 nm nur geringfügig ausfiel. Die weitere Lagerung über Nacht führte dann zu keiner weiteren Veränderung mehr. Damit wurde gezeigt, dass aufgrund der hohen Temperaturen eine Änderung der Struktur von **65** stattfindet. Es wird vermutet, dass bei neutralem pH mehr Hydroxygruppen deprotoniert vorliegen und damit als Phenolate anfälliger für Oxidationen sind als die entsprechenden Phenole. Denkbar sind aber auch Konformationsänderungen des Calixarenes oder Aggregationseffekte. Das sollte bei der späteren Interpretation der thermischen Denaturierung unter neutralen Bedingungen berücksichtigt werden.

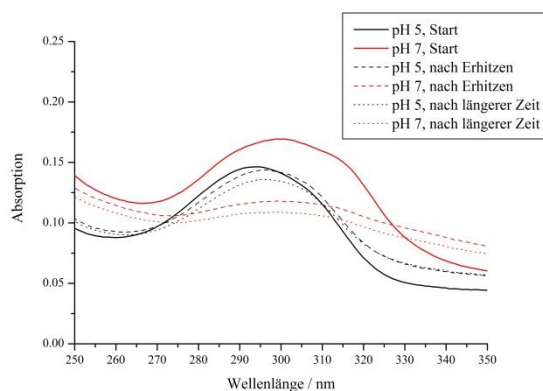


Abb. 4-71 Emissionsspektrum von **65** (52.6  $\mu\text{M}$ ) in Cacodylatpuffer (0.01 M, 5 % DMSO) bei pH 5 und 7. Die Probe wurde angesetzt und ein Emissionsspektrum aufgenommen (Start), im Anschluss wurde dieselbe Probe von 25 °C auf 99 °C erhitzt und nach Abkühlung auf 25 °C ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach Erhitzen). Diese Probe wurde über Nacht gelagert und ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach längerer Zeit).

Danach wurde die thermische Denaturierung von **65** und ctDNA in Cacodylatpuffer bei pH 5 und zum Vergleich auch bei pH 7 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 4-72 dargestellt. Man sieht den charakteristischen Temperatursprung beim Übergang von Doppel- zu Einzelsträngen sehr gut und die Denaturierungstemperaturen konnten daher quantitativ bestimmt werden.

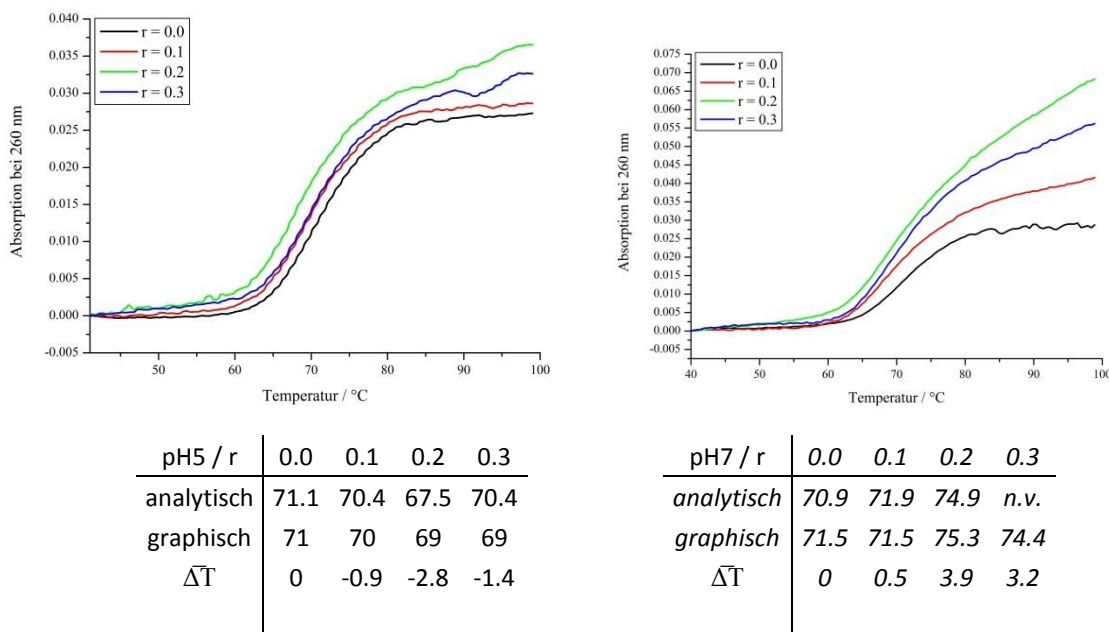


Abb. 4-72 Absorptionsspektrum von ctDNA (88  $\mu$ M, Cacodylatpuffer (0.01 M, pH 5.00) bei 260 m während einer Erwärmung von 25 °C auf 99 °C.  $r$  = Verhältnis  $n(\text{ctDNA})/n(\mathbf{65})$ ; links: pH = 5.0 ; rechts: pH = 6.0.

Insgesamt war bei einer Bestimmung bei pH 5.0 eine geringfügige Temperaturniedrigung um 1.4 °C zu beobachten. Die Auswertung wurde hier jedoch durch einen weiteren Anstieg bei 0.2 und 0.3 Äquivalenten erschwert. Die erhaltenen Einzelstränge scheinen hier eine weitere Wechselwirkung einzugehen. Eine Konzentrationsabhängigkeit war hier noch nicht zu erkennen, jedoch konnten aufgrund von Löslichkeitsproblemen unter diesen Bedingungen keine höheren Anteile an Rezeptor eingesetzt werden. Betrachtet man dagegen die Denaturierung bei einem pH von 7.0, fällt auf, dass die Kurven geringfügig von einer idealen sigmoidalen Kurve abweichen. Es konnte eine leichte Erhöhung der Schmelztemperatur um 3.2 °C und damit eine Stabilisierung der DNA bestimmt werden. Aufgrund der mangelnden UV-Stabilität bei Erwärmung bei physiologischem pH von **65**, ist jedoch nicht sicher, was genau oder welche Struktur diesen Effekt auslöst.

Zum Vergleich wurde der deutlich amphiphilere Rezeptor **90** auch einer thermischen Denaturierung mit ctDNA unterzogen. Hier weist eine Stabilitätsmessung auf Veränderungen der Struktur durch das Erhitzen hin. Bei dieser amphiphilen Verbindung tragen vermutlich Aggregate zur Absorption bei, welche durch das Erhitzen aufgelöst werden. Das UV-Spektrum von **90** nimmt nach dem Erhitzen in seiner Intensität sowohl für eine Messung bei pH 7 als auch bei pH 5 ab. Eine weitere Messung nach längerer Zeit zeigt jedoch pH-abhängig unterschiedliche Ergebnisse. Bei pH 5.0 bleibt die Zusammensetzung nach dem Erhitzen auch über einen längeren Zeitraum konstant wohingegen bei pH 7.0 eine weitere

Erniedrigung der Absorption stattfindet. Das Gleichgewicht der Aggregatbildung ist demnach pH-abhängig. Das UV-Spektrum ist für Verbindung **90** bei einer Erwärmung auf 99 °C nicht konstant, weshalb davon auszugehen ist, dass Veränderungen in der Struktur auftreten.

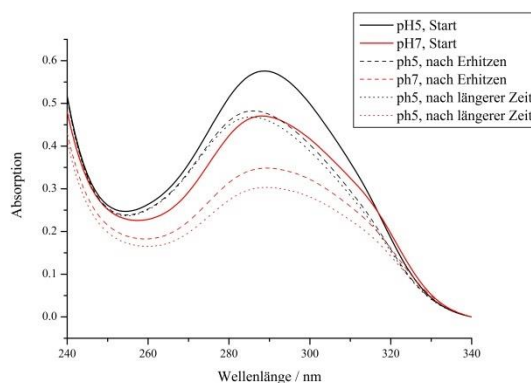


Abb. 4-73 Emissionsspektrum von **90** (10  $\mu$ M) in Cacodylatpuffer (0.01 M, 1 % DMSO) bei pH 5 und 7. Die Probe wurde angesetzt und ein Emissionsspektrum aufgenommen (Start), im Anschluss wurde dieselbe Probe von 25 °C auf 99 °C erhitzt und nach Abkühlung auf 25 °C ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach Erhitzen). Diese Probe wurde über Nacht gelagert und ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach längerer Zeit).

Um Vergleich zwischen den beiden Rezeptoren aufstellen zu können, wurden auch mit **90** Denaturierungsmessungen mit ctDNA in Cacodylatpuffer bei pH 5 und bei pH 7 durchgeführt. Bei der Denaturierungsmessung mit ctDNA und **90** zeigte sich nach dem Erhitzen ein Tyndall-Effekt in den Küvetten mit der Rezeptor/DNA-Mischung (siehe Abb. 4-74). Man sieht, dass die Probe ohne Zugabe des Rezeptors (ganz links) klar ist, wohingegen die Proben, bei denen der Rezeptor **90** zugegeben wurde, eine Trübung aufweisen. Dies könnte auf eine ausgeprägte Aggregation der DNA durch den Rezeptor **90** hinweisen.

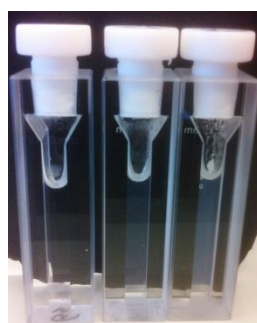


Abb. 4-74 Abbildung der Küvetten nach einer thermischen Denaturierung bei pH 0 5.0. Von links nach rechts sieht man die Ansätze mit den Zusammensetzungen  $[90]/[DNA] = 0, 0.1, 0.3$ .

Weil **90** auch noch eine minimale Absorption bei 260 nm aufweist, mussten die Kurven um eine geringe Änderung bei dieser Absorption korrigiert werden (siehe Abb. 4-75). Es werden charakteristische sigmoidale Kurven erhalten, welche eine Temperaturerniedrigung durch Zugabe des Rezeptors **90** anzeigen.

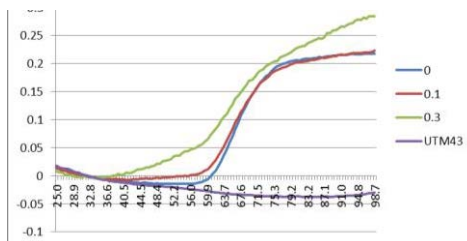


Abb. 4-75 Absorptionsspektren einer thermischen Denaturierung von ctDNA bei Zugabe des Rezeptors **90** mit einem Anteil von 0, 0.1 und 0.3 Äquivalenten. Zum Vergleich wurde das Absorptionsspektrum des Rezeptors **90** ohne ctDNA unter denselben Bedingungen aufgenommen.

Die Auswertung der thermischen Denaturierung von **90** und ctDNA lieferte für eine Bestimmung bei pH 5 eine deutliche Temperaturniedrigung um 8.46 °C für 0.1 Äq. an **90** und 3.46 °C für 0.3 Äq., wobei der letzte Wert nicht ideal auszuwerten war und auch höher sein könnte. Für eine Denaturierung bei pH 7 ist eine Temperaturniedrigung mit 0.9 °C für 0.1 Äq. und 2.2 °C für 0.3 Äq., geringer. Bei der höchsten Konzentration an **90** ist der Anstieg nicht ganz so deutlich, was wahrscheinlich mit Löslichkeitseffekten verbunden ist.

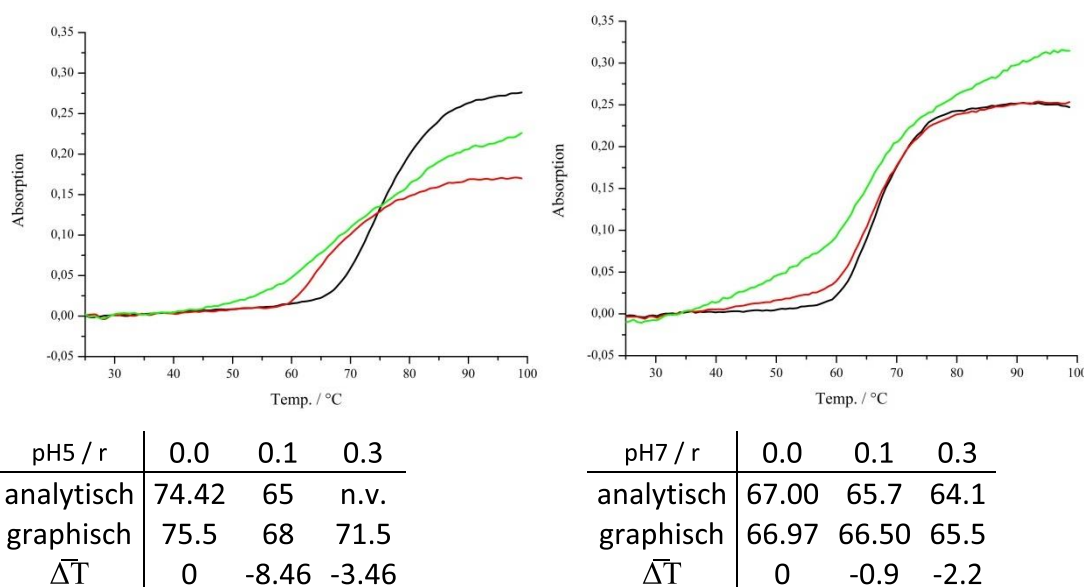


Abb. 4-76 Absorptionsspektren, welche um die Absorption des Rezeptors **90** korrigiert wurden. Links: pH 5.0, rechts: pH 7.0. Kurven: 0.0 Äq. (schwarz), 0.1 Äq. (rot), 0.3 Äq. (grün).

Bei pH 5 sollten die meisten Guanidino-Funktionen protoniert vorliegen und eine mögliche Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat verstärken. Im Gegensatz zu **65** führt **90** zu einer Destabilisierung der ctDNA. Dabei scheinen sich jedoch Aggregate auszubilden, was ein Tyndall-Effekt aufzeigt. Dies erschwert die UV-Messung etwas, entspricht aber den Beobachtungen bei der Gentransfektion, bei der vermutlich aufgrund von Aggregatbildung zwischen Rezeptor und DNA eine Transfektion möglich wird.

#### 4.3.2 Bestimmung der Bindungskonstanten der Verbindungen **65** und **90** mit ctDNA anhand eines Ethidiumbromid-Verdrängungsassays

Zur ersten quantitativen Bestimmung der Bindungskonstante bei einer Komplexierung zwischen **65** und **90** und ctDNA wurde die Standardmethode zur Bindungsanalyse von DNA-bindenden Verbindungen eingesetzt (detaillierte Einführung in den Grundlagen).<sup>125</sup> Dabei macht man sich die Eigenschaften des Ethidiumbromids (EtdBr) zu Nutze, welches als planarer, heteroaromatischer Fluoreszenzfarbstoff durch Interkalation in die Duplex-DNA einen fluoreszierenden Komplex ausbildet. Dabei beträgt die Bindungskonstante  $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  für eine Lösemittel Ionenstärke von 0.01 M, die auch hier eingesetzt wurde.<sup>90</sup> Titriert man eine DNA-bindende Substanz dazu, wird Ethidiumbromid freigegeben und dadurch die Emissionsbande bei 600 nm reduziert. Darüber lässt sich der  $C_{50}$ -Wert bestimmen, welcher der Konzentration der Substanz entspricht, bei welcher eine 50 %ige Abnahme der Fluoreszenz bewirkt wird. Aus den  $C_{50}$ -Werten der Verdrängung von Ethidiumbromid kann dann die Affinität des Titranten berechnet werden.<sup>91</sup>

Die Messungen wurden in Cacodylatpuffer (0.1 mM, pH 5) durchgeführt, um eine vollständige Protonierung der Guanidinogruppen zu gewährleisten. Zunächst wurde die Fluoreszenz einer 0.75  $\mu\text{M}$  (1 Äq.) Ethidiumbromid-Lösung bei einer Anregungswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 560-650 nm gemessen. Diese wurde in einem zweiten Schritt mit 4 Äquivalenten DNA (3.0  $\mu\text{M}$ ) versetzt und nach fünf Minuten Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz gemessen. Der entsprechende Rezeptor, **65** oder **90**, wurde aus einer 1 mM Stammlösung in DMSO mit Cacodylatpuffer (0.1 mM, pH 5) auf 5.0  $\mu\text{M}$  verdünnt. Dann wurde der Rezeptor zutitriert und die Fluoreszenzspektren aufgenommen. Zur Korrektur wurde die Emission des freien Ethidiumbromids von den einzelnen Messungen subtrahiert und die erhaltenen Werte über eine exponentielle Ableitung erster Ordnung gefittet. Alle Werte wurden um die Verdünnung korrigiert und sind Durchschnittswerte aus zwei Messungen. Parallel wurde auch eine Titration ohne ctDNA durchgeführt, um sicher zu stellen, dass keine Wechselwirkung zwischen dem Ethidiumbromid und den Rezeptoren **65** oder **90** stattfindet. Bis auf einen Verdünnungseffekt war hier keine Wechselwirkung zu beobachten (siehe Abb. 7-2). In Abb. 4-77 ist das Verdrängungsexperiment eines EtdBr/DNA-Komplexes mit **65** und **90** dargestellt. Die Messung wurde je zweimal wiederholt und daraus für das Hydroxycalixaren **65** ein Mittelwert von  $\text{IC}_{50} = 0.53 \pm 0.2 \mu\text{M}$  und für das lipophile Calixaren **90**  $\text{IC}_{50} = 0.70 \pm 0.2 \mu\text{M}$  bestimmt.

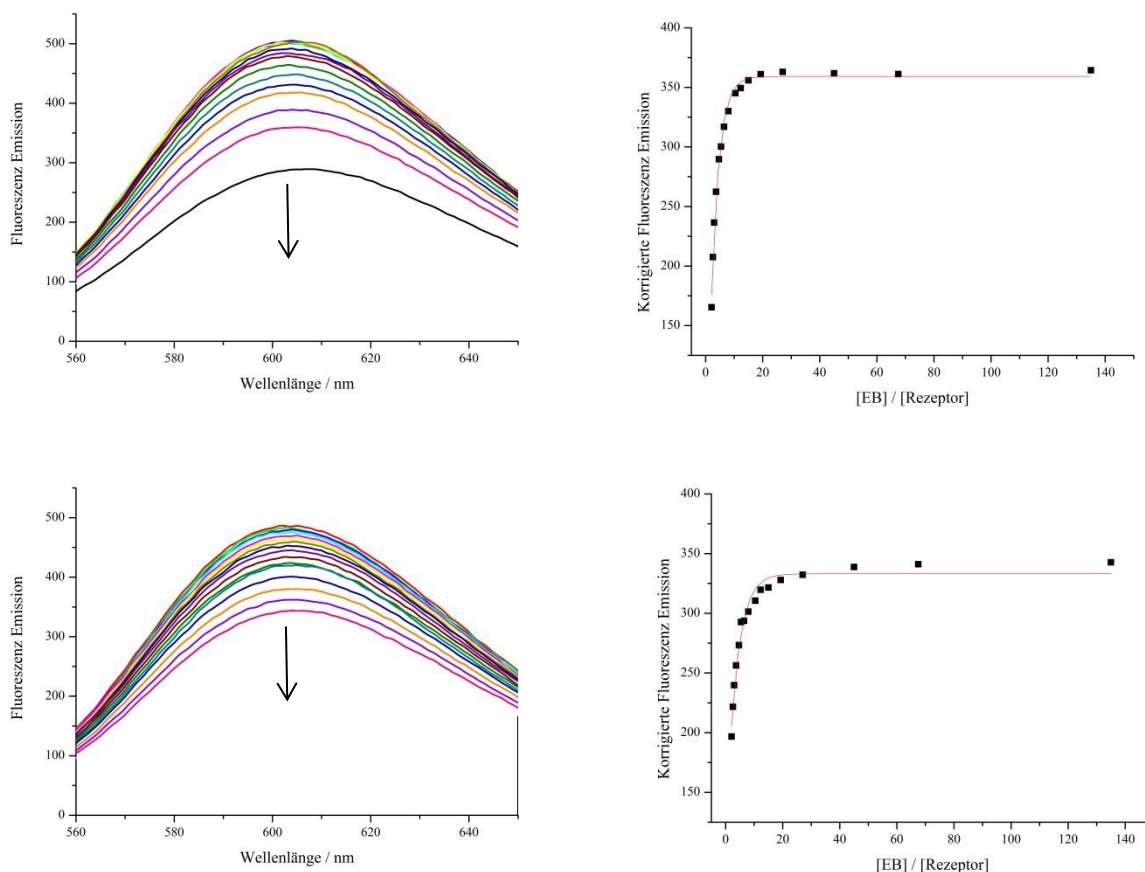


Abb. 4-77 Links: Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit ctDNA und Rezeptor (oben: **65** , unten **90**). Messparameter:  $\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 560\text{-}650 \text{ nm}$ ; Em slit width 20 nm; Ex slit width 20 nm. Rechts: Fit der korrigierten Fluoreszenz-Emission bei 600 nm gegen das Verhältnis von EtdBr/Rezeptor.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass beide Verbindungen Ethidiumbromid aus ctDNA verdrängen können. Damit lässt sich aber nicht sicher sagen, ob es sich bei den beiden Rezeptoren ebenfalls um Interkalatoren handelt. Es wurde auch bei nicht interkalierenden Substanzen ein solcher Effekt bestimmt.<sup>91</sup> Die erhaltenen Werte lassen auf Bindungskonstanten von ungefähr  $10^6 \text{ M}^{-1}$  schließen. Wobei methodenbedingt Unterschiede erst in Zehnerpotenzen entscheidend sind. Interessant ist, dass beide Komponenten eine vergleichbare Affinität zeigen. Das könnte bedeuten, dass hier lediglich die Guanidiniumcarbonyleinheit die entscheidende Rolle spielt und die Octylketten des **90** keinen Einfluss nehmen.

### 4.3.3 Bestimmungen zur Komplexbildung von **65** mit ctDNA mittels ITC

Die ITC erlaubt im Vergleich zu den bereits beschriebenen spektroskopischen Methoden eine genauere Untersuchung der thermodynamischen Vorgänge und damit die Analyse der enthalpischen und entropischen Vorgänge bei der Komplexbildung.

Eine Isothermale Titrationskalorimetrie konnte aufgrund von Löslichkeitsbeschränkungen nur mit **65** durchgeführt werden. Hier wurde eine 10 mM Stammlösung von **65** in DMSO und eine ctDNA Stammlösung mit einer Konzentration von  $2.34 \cdot 10^{-2}$  M in Cacodylatpuffer (0.01 M, pH 7.0) eingesetzt. Es wurden auch die Hintergrundmessungen sowohl der Titration von Rezeptor **65** zu ctDNA als auch die Verdünnung der ctDNA-Lösung durchgeführt. Die Verdünnung des Rezeptors **65** wurde bei der Berechnung berücksichtigt, wohingegen eine Verdünnung der ctDNA in der Zelle keine Verdünnungseffekte zeigt. Die Titration von **65** wurde mit Cacodylatpuffer (0.01 M, pH 5, 6 % DMSO) mit einer Konzentration von 0.6 mM in der Spritze und ctDNA mit 0.1 mM in der Zelle durchgeführt.

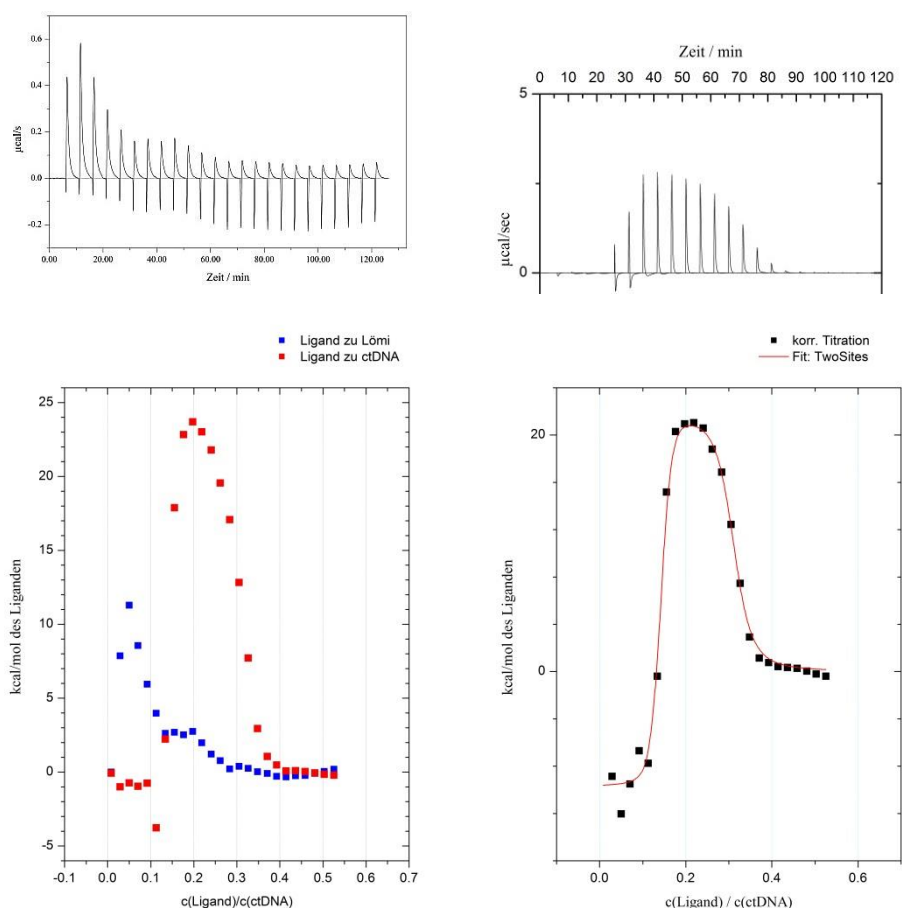


Abb. 4-78 Oben links: Hintergrundmessung der Titration von **65** zum Lösemittel. Oben rechts: Titration von ctDNA mit **65**. Unter links: ITC von ctDNA und **65** (rot), Hintergrundmessung (blau). Unten rechts: Titration abzüglich der Hintergrundmessung und Fit mit einem „TwoSites“-Modell.



Betrachtet man die Zugabe von **65** zum Lösemittel findet zunächst hauptsächlich eine endotherme Reaktion statt, was auf einen Bruch von Aggregaten hinweisen könnte. Diese endotherme Reaktion nimmt mit jeder Zugabe, bis zu einem Plateau bei dem Aggregate nicht mehr aufgebrochen werden, ab. Für die Titration von **65** zu ctDNA gilt, dass der hier stattfindende Prozess endotherm beginnt und auch vollständig abgeschlossen wird. Damit wurde der richtige Konzentrationsbereich gewählt. Mit  $C = n \cdot [ctDNA] \cdot K_a$  erhält man  $C = 82.79$  und liegt damit in einem ganz guten Bereich (Soll 5-500).<sup>81</sup> Jedoch scheinen hier mehrere Prozesse abzulaufen, was eine Interpretation erschwert. Der Fit mit *Origin* ergab für ein „TwoSites“-Bindungsmodell folgende Werte:

$N_1$	$0.131 \pm 0.0013$
$K_1$	$1.74 \cdot 10^9 \pm 7.8 \cdot 10^8$
$\Delta H_1$	$-9725 \pm 481$
$\Delta S_1$	9.66
$N_2$	$0.170 \pm 0.0032$
$K_2$	$4.87 \cdot 10^6 \pm 1.3 \cdot 10^6$
$\Delta H_2$	$2.203 \cdot 10^4 \pm 638$
$\Delta S_2$	104

Die Bindungskonstante für den vermutlichen Bindungsprozess liegt mit  $4.87 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  in der Größenordnung der Ergebnisse des Ethidiumbromid-Verdrängungsassays und mit einem stöchiometrischen Verhältnis von 0.17 ist ein Verhältnis von **65** zu Phosphat von 1:5 denkbar. Dieses thermodynamische Profil mit einem endothermen aber deutlich entropischem Beitrag könnte auf einen Furchenbinder hinweisen.

Eine ITC-Messung mit **65** und ctDNA führte nicht zu einem vollständigen Verständnis der Wechselwirkung. Es wurde aber gezeigt, dass mehrere Prozesse, bei denen es sich sowohl exotherme als auch endotherme handelt, stattfinden. Mit einer Bindungskonstante von  $K = 4.87 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  wurde ein exothermer Teilprozess vermessen, welcher der Ethidiumbromid-Bestimmung entspricht und für eine Bindung ein Verhältnis von einem Rezeptor zu fünf Phosphaten ergibt.

Zusammenfassend zeigten die ersten Messungen mit ctDNA, dass die Bindung mit beiden Rezeptoren aus mehreren Prozessen bestehen, wobei strukturell bedingt Unterschiede zwischen **65** und **90** festzustellen waren.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war zunächst der synthetische Aufbau eines multivalenten Calixaren-abgeleiteten Moleküls, welches von den Bindungseigenschaften des Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotivs (GCP) von *Schmuck* profitieren sollte. Dies gelang durch Variation des Linkers zwischen dem Calix[4]aren-Grundgerüst und den Liganden für ein bipolares tetravalentes Molekül **65** in sieben Syntheseschritten und einem sehr hohen Reinheitsgrad von 94 % und einer Gesamtausbeute von etwa 4 %. Eine weitere zielgerichtete Anpassung gelang durch die Einführung eines Octylrestes am Phenolsauerstoff. Verbindung **90** konnten nach acht Synthesestufen mit einer Ausbeute von 7 % und einer sehr hohen Reinheit von 96 % für die zellbiologischen Untersuchungen isolierte werden.

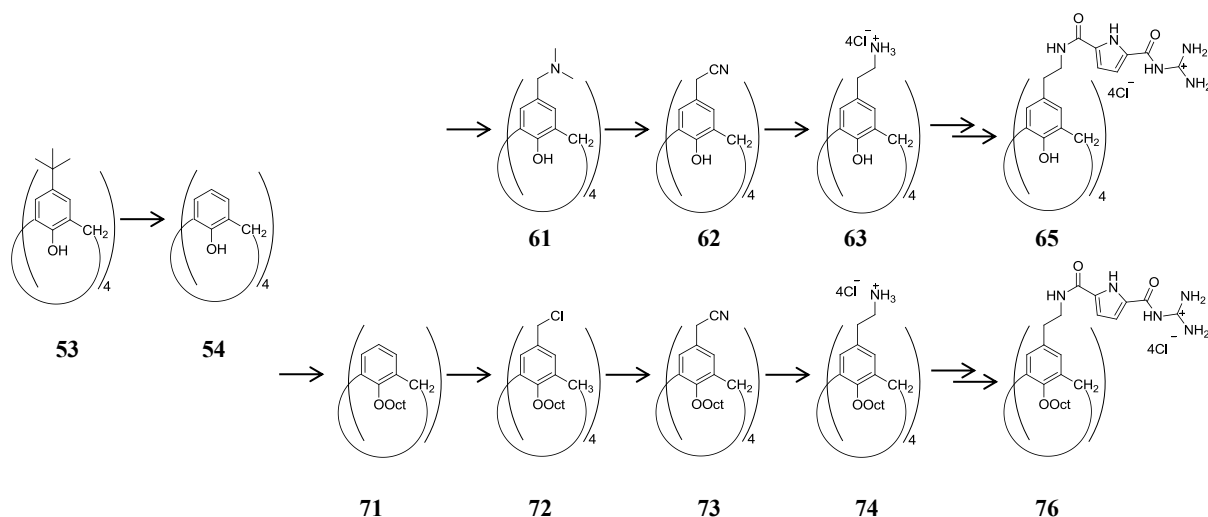


Abb. 5-1 Optimierte Syntheserouten zur Darstellung der Zielmoleküle **65** und **90**.

Damit gelang unter Einführung eines Ethyllinkers erstmals die vierfache Funktionalisierung eines Calix[4]arens mit dem Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotiv. Die beiden Verbindungen **65** und **90** unterscheiden sich sowohl in ihrer Flexibilität als auch in ihrer Lipophilie deutlich voneinander. Die Octylketten fixieren dabei das Calixarene in der cone-

Konformation und führen zur Ausbildung eines Amphiphiles mit einer hydrophoben alkylischen Schwanzgruppe.

Aufgrund der Amphiphilie konnte wie erwartet für **90** aber auch für **65** die Neigung zur Bildung von Mizellen beobachtet werden. Dabei lag die kritische Mizellenkonzentration für **65** zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 7.5  $\mu\text{M}$  und für **90** zwischen 7.5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ , was mittels DPH-Messungen bestimmt und auch mit Hilfe von DLS- und AFM-Messungen bestätigt werden konnte. Dies wurde bei den durchgeführten UV/Vis-Messungen berücksichtigt und die Bestimmungen nur in einem Bereich unterhalb dieser bestimmten Aggregationsgrenze durchgeführt.

Da die GCP-Gruppen der Moleküle für die Guanidinio-Gruppen vergleichsweise niedrige  $\text{pK}_\text{s}$ -Werte aufweisen (siehe Abb. 5-1) wurden die Messungen in wässrig gepufferten Lösungen bei leicht sauren Bedingungen durchgeführt.

	<b>65</b>	<b>90</b>
$\text{pK}_\text{s}$	5.64, 9.92	5.59
$\text{UV}_{\text{max.}} [\text{nm}]$	297	284
$\epsilon$ -Wert bei pH 6 [ $10^3 \cdot \text{cm}^2(\text{mmol})^{-1}$ ]	92.6	51.5

Tab. 5-1 Eigenschaften der neu synthetisierten Moleküle **65** und **90** für die UV-Bindungsstudien.

Qualitative Übersichtsmessungen mit verschiedenen Oxo-Anionen ergaben Hinweise auf Wechselwirkungen von **65** mit v. a. Nucleotiden und Aminosäuren. Für eine Auswahl an Substraten wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie eine Bestimmung der jeweiligen Stöchiometrie über einen JOB-Plot durchgeführt und die entsprechende Bindungskonstante berechnet. Dabei treten substratabhängig bei den verwendeten Messbedingungen 1:1- bzw. 2:1-Komplexe von Rezeptor zu Substrat auf (Übersicht Abb. 5-2).

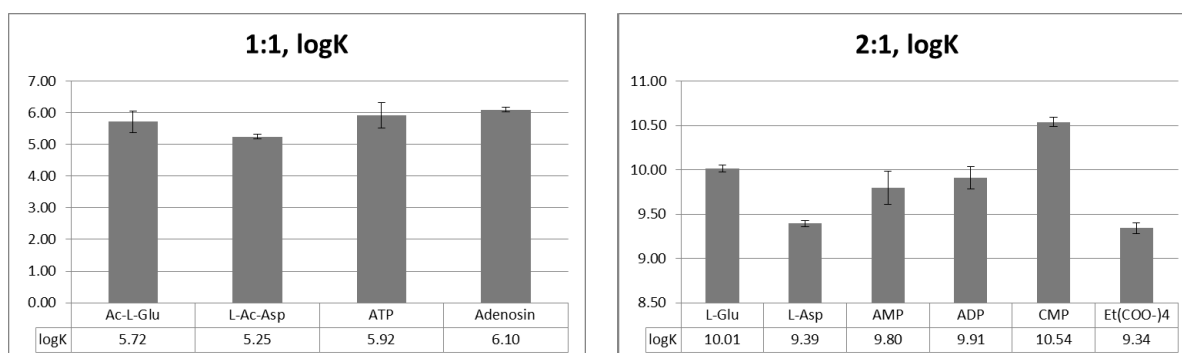


Abb. 5-2 Ermittelte Bindungskonstanten der UV/Vis-Titration von Rezeptor **65·HCl** mit verschiedenen Aminosäuren und Nucleotiden in TRIS-Puffer (1 % DMSO, 0.01 M, pH 6).

Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse zeigt für die 1:1-Komplexe hohe Bindungskonstanten im Bereich von  $\log K = 5.3 - 6.1$  ( $\Delta G = 13.01 - 15.1$  kJ/mol) und für die 2:1-Komplexe im Bereich von  $\log K = 9.3 - 10.5$  ( $\Delta G = 23.15 - 24.81$  kJ/mol). Es ist bekannt, dass Salzbrücken in Wasser bis zu  $5 \pm 1$  kJ/mol für elektrostatische Rezeptor-Substrat-Bindungen freigeben können, wenn die Konformationen einen ausreichenden Kontakt zwischen Anion und Kation erlauben. Damit sollte der tetravalente Rezeptor **65** wie erwartet mehrere Ionen-Ionen-Bindungen ausbilden. Da die Bindungskonstante von Adenosin mit  $\log K = 6.1$  ebenfalls sehr hoch ist, ist anzunehmen, dass dieses aufgrund der fehlenden Phosphatgruppe tiefer in die Kavität des Calixarenes eindringt und durch hydrophobe Effekte ebenfalls zu einem deutlichen Energiegewinn führt.

Mit Hilfe von Kraftfeldrechnungen konnte veranschaulicht werden, dass sehr polare Substrate wie z. B. ATP elektrostatische Wechselwirkungen und auch Wasserstoffbrückenbindungen über die GCP-Gruppe ausbilden können und dass deshalb die Nucleobase nicht tief genug, für eine Wechselwirkung, in die hydrophobe Kavität eintauchen kann. Durch den Einschluss des Substrates von den vier Liganden ist die Erzeugung einer weniger polaren Mikroumgebung für das Substrat denkbar. Damit ist auch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen im wässrigen Milieu erleichtert (Abb. 5-3 links). Das Monophosphat AMP dagegen dringt nach den Berechnungen etwas tiefer in die Kavität ein und erlaubt auf diese Weise die Einbindung eines weiteren Calixarenes und damit die Ausbildung eines 2:1-Komplexes (Abb. 5-3 rechts).

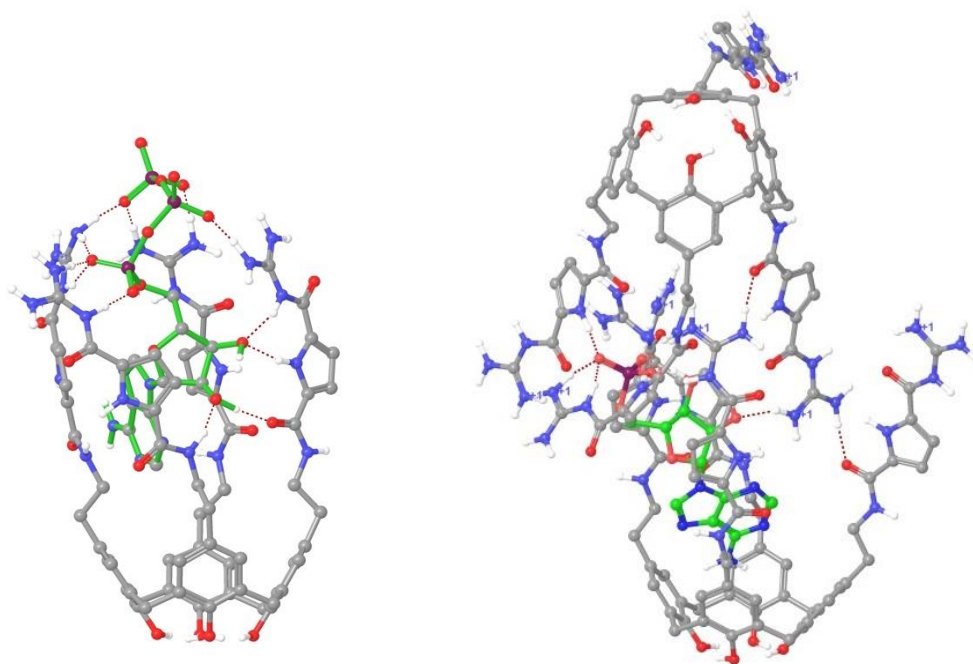


Abb. 5-3 Kraftfeldrechnung des 1:1-Komplexes aus Rezeptor **65** und ATP (links) und eines 2:1-Komplexes mit AMP (rechts). Als Kraftfeld diente OPLS\_2005\* mit Wasser als Kontinuum-Lösemittel.

Vergleicht man bei den 2:1-Komplexen die Adenin-basierten Nucleotide AMP und ADP mit CMP erhält man erste Hinweise auf eine Nucleobasen-Selektivität. Obwohl bei den Nucleotiden die Bindungsstärke mit der Anzahl der Ladungen zunimmt, gilt dies nicht für 1,1,2,2-Ethantetracarboxylat. Dieses weist eine sehr hohe Ladungsdichte auf, ist jedoch sehr kompakt und erschwert damit eine Wechselwirkung mit mehreren GCP-Liganden. Auch dies stützt die These, dass bei einer Komplexbildung mehr als ein Ligand zu einer Komplexbildung beiträgt. Einen weiteren Hinweis darauf erhält man auch bei der Betrachtung der *N*-acetylierten Aminosäuren, welche 1:1-Komplexe ausbilden. Im Vergleich zu den ungeschützten, welche 2:1-Komplexe ausbilden, findet man in beiden Fällen, dass die Bindungskonstante für das Glutaminsäureanalogon mit der längeren Seitenkette jeweils höher ist als für das Asparaginsäureanalogon und eine Anordnung damit sterisch günstiger zu sein scheint. Für die unterschiedlichen Komplex-Zusammensetzungen ist denkbar, dass die hydrophoberen acetylierten Aminosäuren aufgrund der geschützten Aminogruppe tiefer in die Kavität eindringen und es deshalb zwischen zwei Calixarenen eher zu einer Abstoßung durch die positiv geladenen Guanidiniogruppen kommt, da diese sich bei der Komplexbildung dann räumlich näher kommen müssten.

Eine weitere Methode, die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) wurde eingesetzt, wobei sich die Ergebnisse nur schwer mit den durchgeführten UV-Titrationsen vergleichen ließen. Der Grund dafür sind die Löslichkeitseinschränkungen bei den erforderlichen Konzentrationen und mögliche Effekte durch Selbstaggregation. Dies führte zu einer geänderten Stöchiometrie der Komplexe, was zu 3:2-Komplexe zwischen **65** und ATP bzw. ADP führte. Vergleichbar ist aber die Tendenz, dass die Bindungskonstante mit zunehmendem Phosphatanteil auch zu nimmt. Aus energetischer Sicht zeigte die ITC-Messung, dass die Komplexbildung exotherm ist und zudem auch einen günstigen entropischen Anteil aufweist.

Der Rezeptor **65** zeigte damit seine Vielseitigkeit gegenüber verschiedenen Oxo-Anionen und hohe Bindungsaffinitäten für eine multivalente Komplexbildung von Aminosäuren und Nucleotiden, welche auch teilweise eingeschlossen werden können. Bis zu diesem Zeitpunkt liegen noch keine experimentellen Daten vor, welche die Struktur der Komplexe im Detail aufklären können. Eine zukünftige Fortsetzung dieser Bestimmungen könnte durch die Einführung von löslichkeitssteigernden Resten oder einer entsprechenden Anpassung des Mediums erleichtert werden.

### Erkennung der Proteinmaschine P97

In Zusammenarbeit mit *Prof. Meyer* vom ZMB der Universität Duisburg-Essen sollte ein multivalenter Rezeptor mit dem Ziel entwickelt werde, die Pore der Proteinmaschine P97 zu verschließen.

Theoretische Berechnungen in Zusammenarbeit mit *Wilhelm Sicking* zeigten, dass das synthetisierte Calixaren **65** durch seine Größe und Ladungskomplementarität die erforderlichen Eigenschaften für diese Aufgabe vorweist (Abb. 5-4). Eine mögliche Wechselwirkung wurde anhand verschiedener Methoden, darunter ITC, Fluoreszenz Polarisation und MST untersucht.

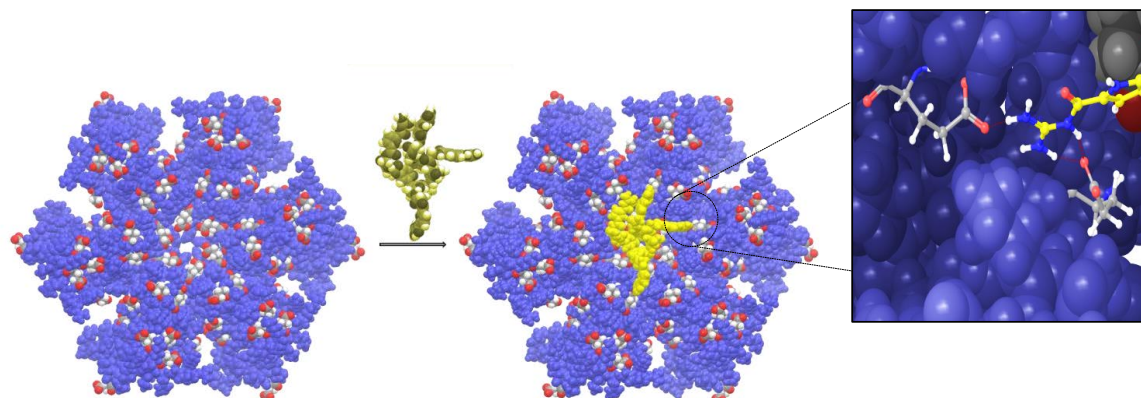


Abb. 5-4 Kraftfeldberechnungen in Zusammenarbeit mit *W. Sicking* implizieren die Eignung des Calixarenes (gelbes Molekül) durch seine Größe und eine Ladungskomplementarität die zentrale Pore des P97 (Abbildung eines Ausschnittes) zu blockieren.

Die konkrete Bestimmung der Bindungsaffinitäten konnte letztlich mit den gegebenen Messmethoden nicht eindeutig bestimmt werden. Die durchgeführten Bindungsstudien wurden dadurch erschwert, dass mit einem Protein wie P97 mehrere supramolekulare Prozesse möglich sind, welche die spektroskopischen sowie die kalorimetrischen Messungen beeinflussen können. P97 besteht aus sechs identischen Protomeren, deren Aggregation unter physiologischen Bedingungen relativ stabil ist. Es ist aber unbekannt, was eine Wechselwirkung mit synthetischen niedermolekularen Substanzen bewirken könnte. Außerdem handelt es sich um eine ATPase, die für ihre Konformationsänderung während der Hydrolyse bekannt ist. Daher werden Bindungsstudien mit P97 und seinen Cofaktoren standardmäßig auch unter Zugabe von ATP und DTT durchgeführt. Für die Messungen zur Aufklärung der Komplexstärke in dieser Arbeit, war es jedoch aufgrund von möglichen störenden Wechselwirkungen nicht enthalten. Diese Einflussnahme auf das P97 war somit ebenfalls schwer einzuschätzen und führte dazu, dass die ITC-Messungen sich leider nicht

eindeutig auswerten lassen. Die Auswirkungen des erforderlichen Anteils an DMSO aufgrund der Löslichkeit des Rezeptors auf die Stabilität des P97 sind ebenso unbekannt.

Zusätzlich wurde ein standardisierter ATPase-Assay von *Dr. Christina Kamp-Meltzer* in der Arbeitsgruppe von *Prof. Meyer* durchgeführt werden. Dabei wird das Orthophosphat  $P_i$ , welches bei der Hydrolyse von ATP frei wird, mit Hilfe eines Farbkomplexes detektiert und die Aktivität der ATPase bestimmt. Hier wurden die beiden Verbindungen **65** und **90** als Inhibitoren geprüft. Während für das Hydroxycalixaren **65** keine Veränderung der  $P_i$ -Produktion beobachtet werden konnte, wurde für das lipophilere Calixaren **90** jedoch eine Abnahme in der  $P_i$ -Konzentration gemessen, was auf eine Inhibierung der ATPase-Aktivität schließen lässt. In einer ersten Messung wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 14.33  $\mu M$  bestimmt. Die ATPase Aktivität wird v. a. von der D2-Domäne bestimmt. Der Rezeptor **90** scheint diese höchstwahrscheinlich aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften besser zu erreichen. Für eine detaillierte Struktur-Wirkungs-Beziehung sind jedoch weitere Messungen erforderlich.

In dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf eine Wechselwirkung des Rezeptors **90** mit P97 detektiert und über einen ATPase-Assay die Inhibierung der Hydrolyseaktivität quantifiziert. Für eine definierte Strukturanalyse sind jedoch weitere Schritte erforderlich, um eine Bindungsstelle zu lokalisieren und die Bindungsaffinität zu bestimmen. Dazu gehören z. B. die Dialyse von P97, was zu verbesserten Eigenschaften für die ITC-Messung führen würde.

#### Bindungsstudien von **65** und **90** mit ctDNA

Aufgrund der guten Bindungseigenschaften gegenüber Nucleotiden im Rahmen dieser Arbeit, wurden auch erste Bestimmungen einer Bindung mit generischer ctDNA durchgeführt.

Bei pH 5 sollten die meisten Guanidinocarbonyl-Funktionen protoniert vorliegen und eine mögliche Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat eines DNA-Moleküls verstärken. Thermale Denaturierungsmessungen in Cacodylat-Puffer bei pH 5 mit **65** führen zu einer geringen Erhöhung der charakteristischen Schmelztemperatur und damit zu einer Stabilisierung der Doppelhelix. Dagegen führt der Rezeptor **90** zu einer Erniedrigung der Schmelztemperatur und damit zu einer Destabilisierung der ctDNA. Die kann auf einen Einfluss der lipophilen Reste auf den Bindungsmodus hinweisen. Es war hierbei die Bildung von größeren Aggregaten zu beobachten, was an einem auftretenden Tyndall-Effekt deutlich wurde.



Dies konnte dann auch mittels AFM-Messungen visualisiert werden, wobei unter Zugabe von **90** zu generischer ctDNA Aggregate sichtbar wurden (siehe Abb. 5-5).

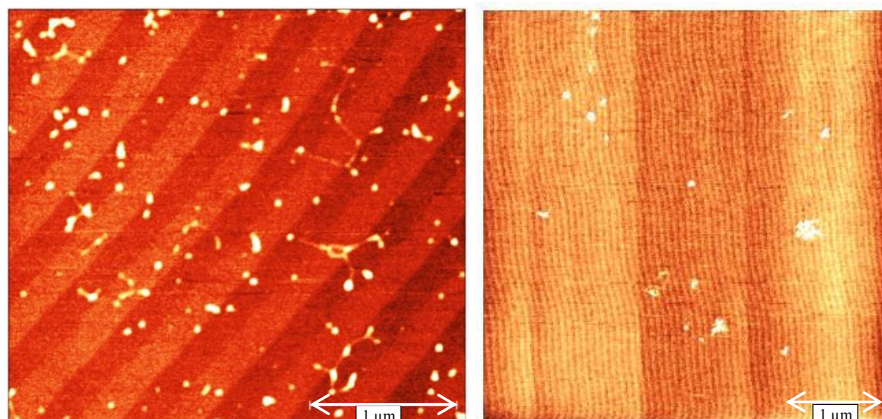


Abb. 5-5 AFM-Höhenprofil von ctDNA (5 µg/ml) in wässriger Lösung von  $\text{MgCl}_2$  (0.26 mM) (links). AFM-Höhenprofil von ctDNA (5 µg/ml) in wässriger Lösung von  $\text{MgCl}_2$  (0.26 mM) und 0.15 Åq. **90** (rechts).

Ein Ethidiumbromid-Verdrängungsassay sollte eine erste quantitative Einschätzung der Wechselwirkungen ermöglichen. Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass beide Komponenten Ethidiumbromid aus ctDNA verdrängen können. Damit lässt sich aber nicht mit Sicherheit sagen, dass es sich bei den beiden Rezeptoren ebenfalls um Interkalatoren handelt. Es wurde auch bei nicht interkalierenden Substanzen ein solcher Effekt bestimmt.<sup>91</sup> Die erhaltenen Werte lassen auf Bindungskonstanten von ungefähr  $10^6 \text{ M}^{-1}$  schließen. Interessant ist, dass beide Komponenten eine vergleichbare Affinität zeigen. Dies erlaubt die These, dass hier lediglich die Guanidiniocarbonyleinheiten die entscheidende Rolle bei der Erkennung von DNA spielen und die Octylketten des Rezeptors **90** darauf keinen Einfluss nehmen.

Eine ITC-Messung mit **65** und ctDNA kann nicht eindeutig interpretiert werden, zeigt aber, dass mehrere Prozesse sowohl exotherme als auch endotherme stattfinden und liefert mit  $K = 4.87 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  einen exothermen Teilprozess, welcher der Ethidiumbromid-Bestimmung entspricht und für eine Bindung ein Verhältnis von einem Rezeptor zu fünf Phosphaten ergibt.

Zusammenfassend zeigten die ersten Messungen mit generischer DNA, dass die Bindung mit beiden Rezeptoren aus mehreren Prozessen bestehen, wobei strukturell bedingt Unterschiede zwischen **65** und **90** festzustellen waren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Untersuchungen, die für eine detaillierte strukturelle Aufklärung des Bindungsmodus erforderlich sind, nicht mehr durchgeführt werden.

### Potenzial des Calixarenes **90** als synthetischer Vektor zur Gentransfektion

Die Eigenschaften der in dieser Arbeit entwickelten Verbindungen erlaubten weiterhin eine anwendungsbezogene Untersuchung auch als Vektor für die Einschleusung fremder DNA in Zellen. Die Verbindung **90** kann durch ihren kationischen Charakter einen Kontakt zur DNA herstellen und durch ihre Amphiphilie höchstwahrscheinlich mit den Membranen interagieren und somit den Eintritt ermöglichen. Diese Bestimmungen können schließlich mit *Ungaros* lipophilen Calixarenen, welche mit Guanidinium-Gruppen funktionalisiert sind, verglichen werden.<sup>73</sup>

Die zellbiologischen Transfektionsmessungen wurden von *Franziska V. Dietrich* in der Arbeitsgruppe von *Prof. Knauer* am ZMB der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Dafür wurden humane Epithelzellen des epidermoiden Karzinoms, die A431-Zellen, eingesetzt und diese unter Verwendung von markierter Plasmid-DNA (pCDNA3-GFP) transfiziert. Dabei zeigte das amphiphile Calix[4]aren **90** seine Fähigkeiten als nicht-viraler Vektor mit einer Transfektionseffizienz von nahezu 2 % im Vergleich zu dem gebräuchlichen Transfektionsreagenz Lipofectamin mit 12 %. Eine Vergleichsbestimmung mit **65**, bei welcher nahezu keine Transfektion zu beobachten war, zeigt die Bedeutung der lipophilen Reste für diesen Prozess. Damit ist anzunehmen, dass **90** direkt mit der Membran interagiert und somit die Aufnahme ermöglicht oder eine zentrale Rolle bei der Freisetzung ins Zytosol spielt.

Natürlich könnte seine Effizienz noch gesteigert werden. Ein möglicher Ansatzpunkt stellt die eingeschränkte Löslichkeit des Substrats **90** unter physiologischen Bedingungen dar. Der Anteil an DMSO variierte zwischen 0.05 % und 0.25 % und sollte daher nicht toxisch für die Zelle sein, könnte aber dennoch einen Einfluss haben.

Ein Vergleich mit *Ungaros* Guanidiniumcalixarenen mit Octylether am *lower rim* zeigt einen ähnlichen Konzentrationsbereich für eine erfolgreiche Gentransfektion bei 20 µM, wobei hierfür eine Mischung aus Rezeptor und Helferlipid DOPE eingesetzt wurde.

Dagegen konnten die Guanidiniocarbonylpyrrolcalixarene ohne Helferlipid auch bei 5 µM noch transfizieren. Die Effizienz ist schwer zu vergleichen, da die Versuchsbedingungen der Experimente voneinander abweichen. Der Einsatz des Guanidiniocarbonylpyrrol-Bindungsmotivs zeigt also im Vergleich zu einer Funktionalisierung mit Guanidiniumgruppen seine Fähigkeit, DNA ohne Helferlipid auch bei geringen Konzentrationen zu transfizieren.

### Fazit und Ausblick

Nach erfolgreicher Synthese konnten die Verbindungen **65** und **90** im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie, ITC und AFM-Messungen auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung von nichtkovalenten Wechselwirkungen mit einzelnen kleinen Substraten aber auch Biopolymeren untersucht werden. Die erbrachten Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass beide Verbindungen ein sehr vielseitiges Potential für die Erkennung von biologisch relevanten Substraten aufweisen. Jedoch traten bei einzelnen quantitativen Bestimmungen Einschränkungen der Messmethode auf. Dazu zählten Löslichkeitseinschränkungen aber auch die Überlagerung von Fluoreszenzspektren.

Für zukünftige Arbeitsschritte sollten zunächst die Eigenschaften der Rezeptoren dahingehend optimiert werden, dass löslichkeitssteigernde Gruppen eingeführt werden. Dies wäre z. B. über die Einführung von Glycoethern am *lower rim* möglich, mit denen in dieser Arbeit bereits erste Erfahrungen gemacht wurden, oder eine Variation des Linkers zwischen Calixarengerüst und Liganden am *upper rim*. Eine weitere Erleichterung der durchführbaren spektroskopischen Methoden wäre eine Einführung eines Fluoreszenzmarkers. Damit wären z. B. die Fluoreszenz-Polarisation zur Bestimmung der Bindung zu P97 und auch eine Lokalisation während der Gentransfektion möglich.

Grundsätzlich stellt das Calix[4]aren-Grundgerüst eine ideale Plattform dar und könnte im Sinne einer Selektivitätssteigerung mit z. B. Aminosäuren funktionalisiert werden. Hierfür wäre der Aufbau einer Bibliothek mit Hilfe eines kombinatorischen Ansatzes geeignet, welcher die Verwendung von sowohl proteinogenen als auch künstlichen Aminosäuren erlauben würde. Auf diese Weise wird die Untersuchung der notwendigen Eigenschaften für ein Target beschleunigt.

Als zukünftige Anwendung für diese untersuchte Substanzklasse wäre der expandierende Bereich des „*drug delivery*“ denkbar. Hierbei sind Eigenschaften, wie die Selbstassemblierung von Amphiphilen und somit eine Einschussmöglichkeit für pharmazeutisch aktive Komponenten im Kern oder an der Oberfläche und der Transport zu seinem therapeutischen Target von großer Bedeutung. Diese Strategie führt dazu, dass ein eingeschlossener Wirkstoff vor einem enzymatischen Abbau geschützt wird. Durch ein supramolekular regulierbares System wäre ein kontrolliertes oder initiiertes Freisetzen eines Wirkstoffes möglich. Wird der Wirkstoff auf diese Weise direkt zum Target gebracht kann eine Verabreichung reduziert werden und damit auch die Nebenwirkungen eingeschränkt werden.



## 6 SUMMARY AND PROSPECTS

The aim of this study was the synthesis of a multivalent molecule based on a calixarene scaffold, which should benefit from the binding properties of Schmuck's guanidiniocarbonylpyrrol binding motif (GCP). This was achieved by the variation of the linker in between the calix[4]arene core and the ligands. This way a bipolar tetravalent molecule **65** was synthesized in seven steps with a very high purity of 94 % and a total yield of 4 %. Another target-oriented molecule was synthesized by the introduction of an octyl group at the phenol oxygens. Molecule **90** was isolated within eight synthetic steps with a total yield of 7 % and a high purity of 96 %.

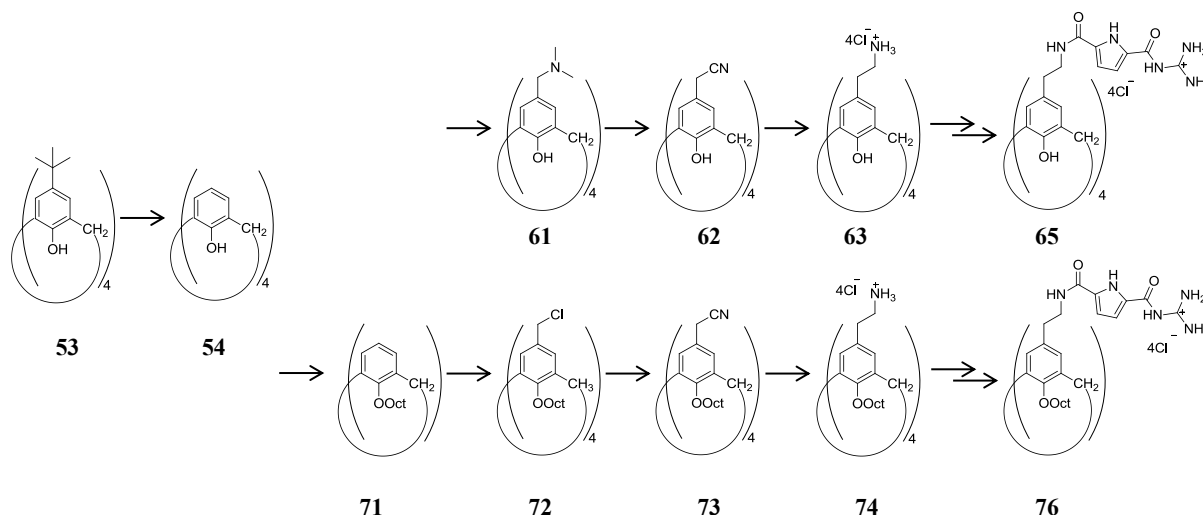


Abb. 6-1 Optimized synthetic routes for the target molecules **65** und **76**.

Thereby, with the introduction of an ethyl linker, functionalization of the calix[4]arene with four GCP units was realized for the first time. The two compounds **65** and **90** differ both in flexibility and lipophilicity. The octyl group fixes the calixarene in its *cone*-conformation and therefore the compound resembles an amphiphile with a hydrophobic alkyl tail group.

Because of the amphiphilic character the ability to form micelles was observed as expected for **90** but also for **65**. The critical micelle concentration for **65** was in between 5  $\mu\text{M}$  and

7.5  $\mu\text{M}$  and for **90** it was determined to be between 7.5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ . This was determined using diphenylhexatrien as a probe und confirmed by DLS and AFM. Their ability for self-aggregation had to be taken into account and the concentration was kept below this value when measuring binding constants with UV/Vis spectroscopy.

Because the GCP-groups show relative low  $\text{pK}_s$ -values the measurements were done in aqueous buffers under slightly acidic conditions.

	<b>65</b>	<b>76</b>
$\text{pK}_s$	5.64, 9.92	5.59
$\text{UV}_{\text{max.}} [\text{nm}]$	297	284
$\epsilon$ -Wert bei pH 6 [ $10^3 \cdot \text{cm}^2(\text{mmol})^{-1}$ ]	<b>92.6</b>	51.5

Tab. 6-1 Important properties of the new synthesized molecules **65** and **76** for the UV/Vis binding studies.

Qualitative measurements using UV/Vis spectrometry with various oxoanions indicated that there are some interactions of receptor **65** mainly with nucleotides and amino acids. For some of these substrates the stoichiometry as determined by a JOB-plot was measured and the binding constants were determined. The results demonstrated 1:1- and 2:1-complexes of receptor to substrate in dependence of the substrate.

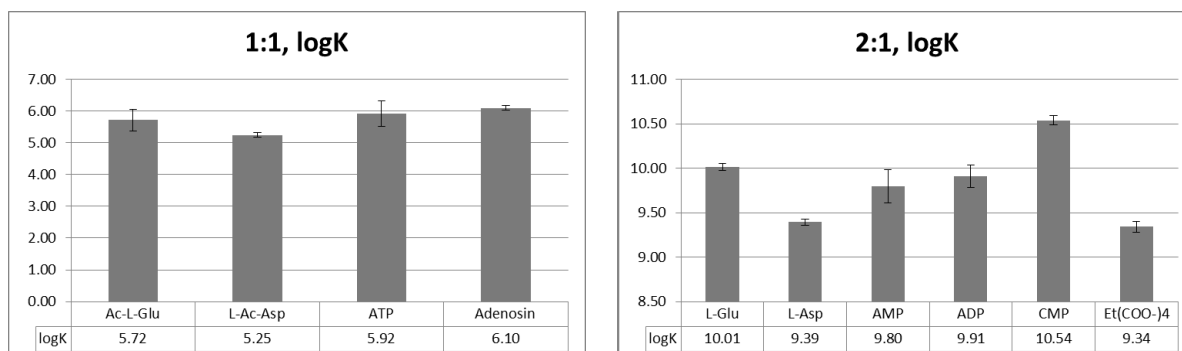


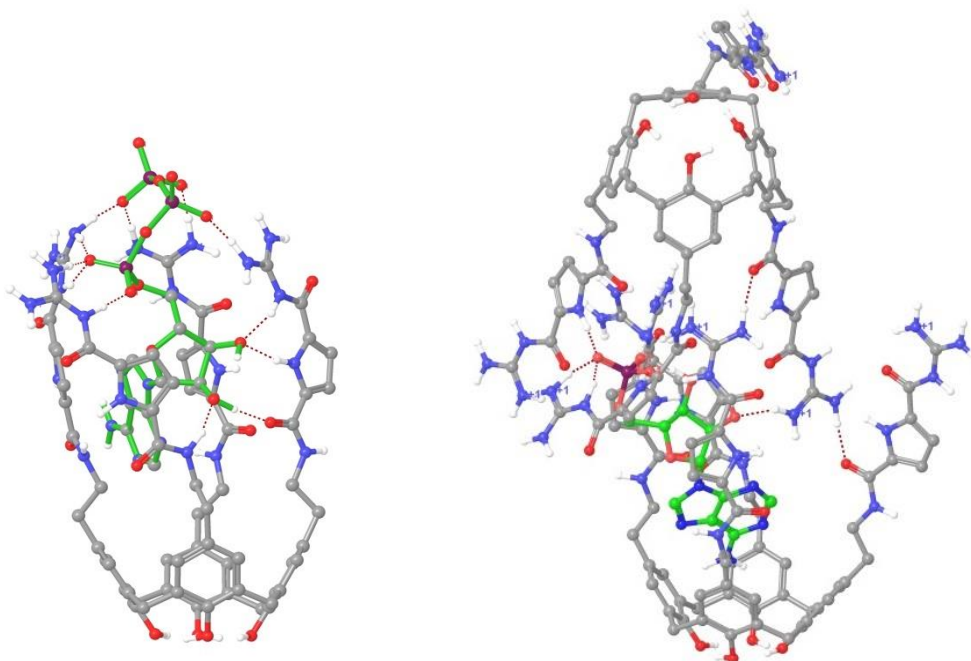
Abb. 6-2 Measured binding constants of the UV/Vis titration of receptor **65**-HCl with different amino acids and nucleotides in TRIS-buffer (1 % DMSO, 0.01 M, pH 6).

By comparison, the results for the 1:1-complexes showed high binding constants in the region of  $\log K = 5.3 - 6.1$  ( $\Delta G = 13.01\text{--}15.1$  kJ/mol) and for the 2:1-complexes  $\log K = 9.3 - 10.5$  ( $\Delta G = 23.15 - 24.81$  kJ/mol). It is well known that salt bridges in water can contribute  $5 \pm 1$  kJ/mol to electrostatic receptor substrate binding when the orientation of both partners is suitable. That means receptor **65** seems to form more than one ion-ion-pairing. As the binding constant with the less polar adenosine with  $\log K = 6.1$  is also very high, it is assumed that here the binding energy comes from hydrophobic effects.

Force field calculations showed that very polar substrates like ATP built electrostatic interactions and H-bonds with the GCP-groups and therefore the nucleobase would not enter

the cavity. With the enclosure of the substrate in between the four ligands a less polar microenvironment is formed around the substrate which leads to stable H-bonds even in aqueous media (Abb. 5-3 links).

The monophosphate AMP in contrast enters deeper into the cavity and leads to an involvement of another calixarene and therefore the formation of a 2:1-complexe (Abb. 7-3 right).



*Abb. 6-3 Force field calculations for the 1:1-complexe of receptor 65 and ATP (left) and for the 2:1-complexe with AMP (right). As force field OPLS\_2005\* was used with water as continuum solvent.*

The comparison of the 2:1-complexes of the adenine based nucleotides AMP and ADP to CMP implies nucleobase selectivity. Although for the nucleotides the binding strength increases with the number of charges, this is not the case for the 1,1,2,2-ethanetetracarboxylate. This four-fold carboxylate exhibits a very high charge density but is also very compact and therefore makes it difficult for more than one GCP ligand to interact. This also underlines the assumption that the complexation is stabilized with more than one ligand. To obtain another indication one might look at the *N*-acetylated amino acids forming a 1:1-complexe. Compared with the 2:1-complexes with the *L*-Glu and *L*-Asp as substrates, in both cases the binding constant for the glutamic acid derivatives is higher than for the aspartic acid derivatives. The glutamic acid derivatives possess a longer side chain and therefore probably a sterically more favored orientation. The different stoichiometries could be explained with the more hydrophobic acetylated amino acid going deeper into the cavity. Therefore the

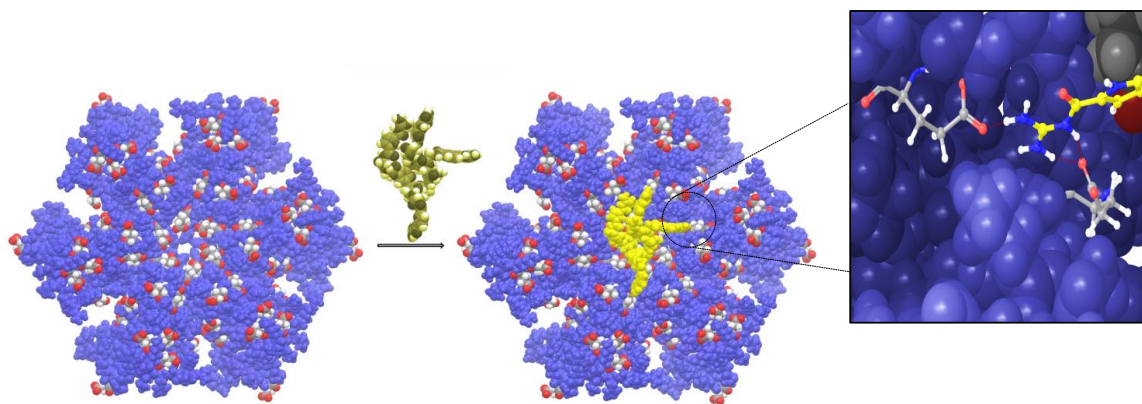
two positively charged guanidinio groups would be in close proximity and would repel each other.

Other methods like isothermal titration calorimetry (ITC) were used but the results were difficult to compare with the UV-titrations because of solubility problems and self-aggregation processes which occurred at higher concentrations. This led to a different stoichiometry which results in a 3:2-complexes for **65** and ATP respectively AMP. But the general tendency of increasing binding constants with an increasing phosphate portion was the same. From an energetic point of view, the complex formations are exothermic with favorable entropic contributions.

In summary receptor **65** showed its versatility towards different oxoanions and high binding constants for the multivalent complexation of amino acids and nucleotides which are partly incorporated. Up to this point there are no experimental data presenting the detailed structure of the different complexes. For future work it would be necessary to improve the receptor's water solubility.

#### Recognition of the protein machine p97

In collaboration with *Prof. Meyer* from the ZMB of the university Duisburg-Essen a multivalent receptor was designed with the aim to block the pore of the protein machine p97. Force field calculations in cooperation with *Wilhelm Sicking* indicate that the synthetic calixarene **65** would be sufficient in size and charge complementarity for this task (Abb. 5-4). The possible interaction was examined with different methods like ITC, fluorescence polarization und fluorescence spectroscopy.



*Abb. 6-4 Force field calculations in cooperation with Wilhelm Sicking indicate the ability of the calixarene **65** (yellow structure) in size and charge complementarity for the aim to block the pore of p97 (figure shows only an extract of the protein).*



The precise determination of the binding constant could not be obtained using the given methods. The performed binding studies were hindered because measurements with proteins like p97 lead to a lot of possibilities for supramolecular interactions. All these processes could easily influence the spectrometric and calorimetric measurements. P97 consists of six identical protomers whose aggregation is relatively stable under physiological conditions. It is not established what the interaction with synthetic low-molecular substances would lead to. Besides p97 is an ATPase which is known for its conformation changes during hydrolyses. Therefore binding studies with p97 and its co-factors usually are executed with the addition of ATP, and dithiothreitol (DTT) for preservation of oxidation. For these measurements neither ATP nor DTT were not used to avoid additional interactions with the receptor. This influence on the structure of p97 was hard to estimate und could lead to the difficulties in interpretation of the ITC measurements. The effect of the necessary portion of DMSO because of solubility issues is also unknown.

Additionally an ATPase assay was operated by *Dr. Christina Kamp-Meltzer* from the working group of *Prof. Meyer*. Here the orthophosphate  $P_i$ , which is released during hydrolysis of ATP, is detected with the help of a colored complex, and the resulting activity of the ATPase is measured.

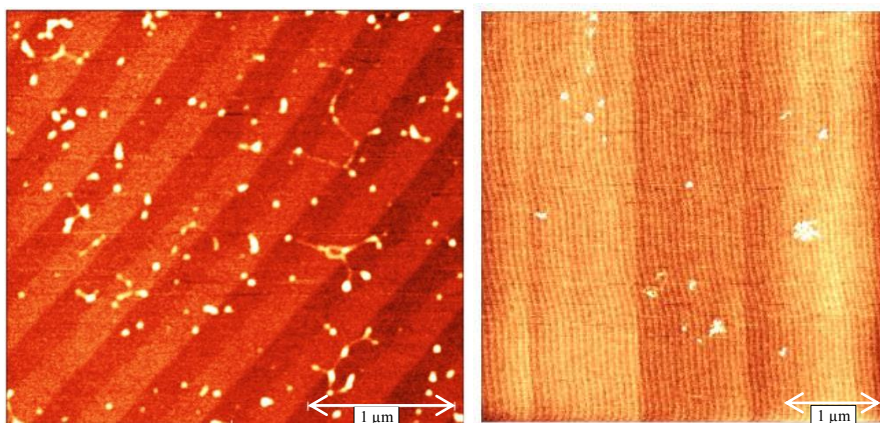
The receptors **65** and **90** were tested as inhibitors. The hydroxyl calixarene **65** showed no effects on the  $P_i$  production. The more lipophilic calixarene **90** led to a decrease of the  $P_i$  concentration which gives a hint to the inhibition of the ATPase activity. The first measurement provided an  $IC_{50}$ -value of 14.33  $\mu$ M. The ATPase activity is mainly dictated by the D2 domain which the receptor **76** seems to accomplish because of its lipophilic properties. For more detailed structure-activity-relations more experiments are necessary.

In this study first assumptions were found on the interaction of receptor **90** with p97 which was mainly detected using an ATPase assay. Thus leading to the quantification of the inhibition of the hydrolytic activity. For a more detailed structure analysis there are more experiments necessary. Here it would be helpful to dialyze the p97 medium to improve the properties for the ITC measurement.

### Binding studies of **65** and **90** with ctDNA

Because of the strong binding properties with nucleotides, the determination of the binding with DNA was investigated.

At pH 5 most of the guanidinocarbonyl functions should be protonated and should lead to electrostatic interactions with the phosphate backbone of the DNA molecule. Thermal denaturation experiments led to a little increase of the characteristic melting temperature and therefore to the stabilization of the double helix. In contrast the measurement with receptor **90** led to a decrease of the melting temperature and seems to destabilize the ctDNA. This can point to an influence of the lipophilic residues on the binding mode. The formation of larger aggregates was detected because of an arising Tyndall effect. This could be visualized additionally using atomic force microscopy (AFM) measurements (see Abb. 5-5).



*Abb. 6-5 AFM height profile of ctDNA (5 μg/ml) in aqueous MgCl<sub>2</sub> (0.26 mM) (left). AFM height profile of ctDNA (5 μg/ml) in aqueous MgCl<sub>2</sub> (0.26 mM) and 0.15 eq. **90** (right).*

An ethidium bromide displacement assay was used to obtain a quantitative estimate for the binding constant. The obtained results demonstrate that both receptors are able to displace ethidium bromide from ctDNA with binding constants in the range of  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . But this still cannot be taken as evidence that both receptors are intercalators. It is possible also for non-intercalating substrates to lead to such an effect.<sup>91</sup> But it is very interesting that both compounds show a similar affinity. This leads to the assumption that mainly the guanidinocarbonyl unities are essential for the recognition of DNA and the octyl residues of the receptor **90** are not significant for that.

An ITC measurement conducted with **65** and ctDNA could not be interpreted unambiguously. But it reveals that there are both exothermic and endothermic steps. The measured exothermal process exhibited a binding constant of  $K = 4.87 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  which is in line with the

determination made using the ethidium bromide displacement assay. Here the ration of the complex was determined as one receptor to five phosphates.

In conclusion the measurements with generic DNA demonstrated that the binding of both receptors with DNA consists of several processes and differences were found for the structurally different compounds **65** und **90**.

In this work unfortunately continuative measurements that would lead to a more detailed elucidation of the binding mode, whether the receptors are groove binders or intercalators could not be achieved yet.

#### The capability of the calixarene **90** as synthetic vector for gene transfection

The characteristics of the synthesized compounds permit the promising investigation as vectors for the transport of foreign DNA into cells. Compound **90** is able to bind to DNA due to its cationic charges and because of its amphiphilic character it could interact with the cell membrane and allow the entrance into the cell. The results should be compared with *Ungaros* lipophilic calixarenes which are substituted with guanidinium groups.<sup>73</sup>

The cell biological transfection measurements were undertaken by *Franziska V. Dietrich* in the working group of *Prof. Knauer* from the ZMB of the university Duisburg-Essen. Therefore humane epithel cells of the epidermoid carcinoma (431-cells) were used and they were transfected with labelled plasmid DNA (pCDNA3-GFP). Here it was determined that the amphiphilic calix[4]arene **90** is capable of transfection with an efficiency of 2 % whereas the transfection reagent lipofectamin showed an efficiency of 12 % under the same conditions. The experiment with **65** as a vector showed nearly no transfection, what means that for the transfection the lipophilic residues are essential. Presumably the compound **90** directly interacts with the membrane and therefore enables the entry or plays the central role for the release of the DNA into the cytosol.

Of course the efficiency of **90** could still be enhanced. One promising idea is to improve the solubility of the compound **90** under physiological conditions. The ratio of DMSO varied between 0.05 % and 0.25 % and should not be toxic for the cell, but of course there could be some negative effects anyway.

In comparison with *Ungaros* guanidinium calixarenes with octyl ether at the *lower rim* **90** shows a very similar concentration range for a successful gene transfection at 20 µM. Whereas *Ungaro* used a mixture of receptor and helper lipid, DOPE, to optimize the efficiency. In contrast the guanidiniocarbonylpyrrol calixarenes could still perform

transfection at 5  $\mu$ M without helper lipid. The value of efficiency could hardly be compared because the different conditions used in both experiments.

### Conclusion and outline

After having successfully synthesized the compounds **65** and **90** in the context of this work, measurements like UV/Vis-spectroscopy, ITC and AFM confirmed their capability to build non-covalent interactions with small substrates but also biopolymers. Some restrictions occurred by the use of some methods because of solubility problems and self-aggregation or even the problem of superimposed fluorescence spectra.

For future work it would be necessary to vary the properties of the receptors in this way that solubility enhancing groups are introduced. This could be for example the substitution with glycol ethers at the *lower rim* or the variation of the linker in between the calixarene core and the ligand at the *upper rim*. Another facilitation of the accomplishable spectroscopic methods would be the introduction of a fluorescence label. This would for example allow to use fluorescence polarization for the determination of the recognition of p97 and also would enable any localization during gene transfection.

In general the calix[4]arene core is an ideal platform and could be functionalize with amino acids to gain more selectivity towards the substrate. Therefore the buildup of a combinatoric library would be interesting which would allow the application of proteinogenic but also artificial amino acids. This way, one could enhance the determination of the necessary properties for the given target.

As a future application for the newly introduced substance class, in general the enormous expanding area of drug delivery is possible. Therefore, characteristics like the self-assembling of amphiphiles and also the encapsulation possibility for pharmaceutical active compounds in the cavity or at the surface, and the transport to the therapeutic target is very important. This strategy means that the encapsulated drug is protected against enzymatic degradation. Using a supramolecular adjustable system, a controllable and initiated release of the drug could be possible. If the drug is directly transported to the target, the amount of application can be reduced and in conclusion although the side effects.

---

## 7 EXPERIMENTELLER TEIL

---

### 7.1 EXPERIMENTELLE ANGABEN

#### Lösemittel und Reagenzien

Die technischen Lösemittel wurden destilliert. Wasserfreie Lösemittel wurden wie folgt erhalten: Tetrahydrofuran und Diethylether wurden mit Natrium und Benzophenon als Indikator mehrere Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert. Dichlormethan wurde über Calciumchlorid vorgetrocknet und mit Calciumhydrid unter Rückfluss erhitzt, um anschließend destilliert zu werden. Dimethylformamid wurde mit Calciumhydrid unter vermindertem Druck unter Rückfluss erhitzt, dabei wurden etwa 10 Vol % als Vorfraktion verworfen. Deuterierte Lösemittel wurden von der Firma *Deutero* bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

VE Wasser, welches zur Reinigung von Glasgeräten und für die Synthesen zum Einsatz kam, verfügte über Trinkwasserqualität und wurde über Ionenaustauscherharze geleitet. Für sämtliche chromatographischen und spektroskopischen Untersuchungen wurde hochreines Wasser, welches mittels MicroPure Wasseraufbereitungssystem der Firma TKA von VE Wasser erzeugt wurde, verwendet.

Bei den eingesetzten Reagenzien handelt es sich, soweit nicht anders angegeben, um kommerziell erhältliche Chemikalien der Firmen *Alfa Aesar*, *Acros Organics*, *Sigma-Aldrich*, *Merck*, *Fluka*, welche soweit nicht anders angegeben ohne weitere Reinigung eingesetzt wurden. Das Protein P97 wurde von Dr. Christina Kamp-Meltzer aus der AG Meyer im ZMB der Universität Duisburg-Essen exprimiert und gereinigt.

#### Schutzgas

Als Schutzgas wurde Argon der Firma *Linde* verwendet, welches vor Gebrauch über eine Trockenleitung aus Orangegel und Calciumchlorid geführt wurde.

### Lyophilisation

Zur Gefriertrocknung wasserlöslicher Verbindungen wurde die Anlage Alpha 1-4 LD plus von *Christ* in Kombination mit der Hybrid-Pumpe RC6 der Firma *vacuubrand* verwendet.

### Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Reaktionskontrolle per Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfolien des Typs POLYGRAM® SIL G/UV254 (Schicht: 0.2 mM Kieselgel mit Fluoreszenzindikator) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Detektion erfolgte entweder mit Hilfe von UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ,  $310 \text{ nm}$ ) oder bei schwach und nicht UV-aktiven Substanzen (v. a. für Amine bzw. Aminosäuren) durch Anfärben mit einer sauren Ninhydrinlösung in Ethanol. Einige Calix[4]arenderivate lassen sich mithilfe einer Iodkammer anfärben.

### Flash - Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung der Verbindungen erfolgte mittels Kieselgel des Typs Silica Gel 60M der Firma *Macherey-Nagel* (Korngröße 0.04-0.063, 230-400 mesh ASTM). Die verwendeten Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Zudem stand zur Reinigung von schwer trennbaren Produktgemischen eine präparative "Medium Performance Liquid Chromatography" (MPLC) zur Verfügung. Diese bestand aus einer Kronlab KD50/100 SS Pumpe und einem Kronlab UV/Vis 2.5 Detektor. Flash Chromatographie wurde mit unter Vakuum trocken gepackten Silica Kronlab Glassäulen (TAC25/500LS0-SR-2) mit 25 mm Durchmesser und 250-500 mm Länge durchgeführt.

### Automatisierte Flash-Säulenchromatographie (MPLC)

Zur Trennung von polaren Substanzen wurde die Liquid Chromatography Flash Anlage der Firma *Armen Instrument* verwendet. Die eingesetzten Säulen wurden mit RP18 Material, YMC\*GelODS-A (12 nm, 50  $\mu\text{M}$ ) beladen. Das zu trennende Produktgemisch wurde in wenig Elutionsmittel gelöst und über einen Spritzenfilter von möglichen festen Bestandteilen befreit.

### Präparative HPLC

Zur Reinigung von Substanzen, welche für Messungen einen sehr hohen Reinheitsgrad erforderten, wurde eine präparative HPLC, bestehend aus der Pumpe SepTech™ von *Merck*, einer Mischkammer von *Knauer*, des Detektors SPD-10A von *Shimadzu* und einer Säule des Typs YMC-Pck ODS-A von *YMC* eingesetzt. Das Lösemittel wurde vorab über eine Nylon

Membran (0.45  $\mu\text{m}$  x 47 mm) der Firma *Supelco* zur Bereiung von Luftbläschen und festen Partikeln gegeben.

### Ansatz DNA-Lösung

5 mg ctDNA-Fäden (*Sigma-Aldrich*) wurden mit Hilfe von Plastikpinzetten in einen Felkin überführt. Es wurden 750  $\mu\text{l}$  Cacodylatpuffer (0.05 M, pH 7) hinzugegeben und geschwenkt bis eine gleichmäßige Verteilung erreicht war. Diese Suspension wurde über Nacht gekühlt und am nächsten Morgen unter Einsatz eines Ultraschallfingers gleichmäßig vermennt (8mal je 4 Sekunden). Die entstandene Lösung wurde über einen Spritzenfilter gegeben und dieser mit 0.3 ml Pufferlösung einmal gespült und die beiden Lösungen vereint. Die Konzentration dieser ctDNA-Lösung wurde UV-spektroskopisch mit  $\epsilon(\text{ctDNA}) = 6600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  mehrfach bestimmt.

## 7.2 ANALYTISCHE METHODEN

### Schmelzpunktbestimmung

Die Messung wurde an einem Schmelzpunktbestimmungsapparat B-540 der Firma *Büchi* in offenen Schmelzpunktröhrchen durchgeführt. Die Ergebnisse sind nicht korrigiert.

### pH-Messung

Zur Bestimmung des pH-Wertes wurde das Labor-pH-Meter 766 der Firma *Knick* in Kombination mit dem Sensor Minitrode der Firma *Hamilton* verwendet. Zur Kalibrierung wurden kommerziell erhältlichen Pufferlösungen (pH 4.00 und pH = 7.00) eingesetzt.

### Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

300 MHz und 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, sowie 75 MHz und 125 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit einem DMX 300 bzw. DRX 500 Spektrometer der Firma Bruker bei 25 °C aufgenommen. Die verwendeten Lösemittel dienten als interner Standard für die angegebenen chemischen Verschiebungen in ppm:  $^1\text{H}$ :  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7.26$  ppm),  $\text{DMSO-d}_6$  ( $\delta = 2.50$  ppm);  $^{13}\text{C}$ :  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77.16$  ppm),  $\text{DMSO-d}_6$  ( $\delta = 39.52$  ppm). Die Aufspaltungen der einzelnen Signale sind wie folgt abgekürzt: s = Singulett, br. s = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit Hilfe von TopSpin Vers. 3.1 der Firma *Bruker*.<sup>126</sup>

### Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels einer HPLC der Firma *Dionex*. Das System besteht aus einer Pumpe P680-HPLC, automatischem Probeninjektor, ASI-100 und UV-Detektor 340U. Als Säulen wurden YMC-Pack ODS-A und YMC-Pack ODS-AQ (150 x 3.0 mM i.d. S-5  $\mu$ M, 12 nm) der Firma *YMC* eingesetzt. Als Lösemittel wurden neben hochreinem Wasser Lösemittel der Reinheitsstufe „HPLC gradient grade“ der Firma *VWR* eingesetzt.

### Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie)

Die Infrarotspektren wurden an einem FT-IR 430 mit dem MiRacle<sup>TM</sup> ATR-Aufsatz, ausgestattet mit einem ZnSe-Kristall, der Firma *PIKE Technologies* gemessen. Die Lagen der Banden sind in Wellenzahlen ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben, die Intensitäten werden wie folgt abgekürzt: s = stark, m = mittel, w = wenig intensiv.

### Massenspektrometrie

Gerät für niedrigaufgelöste Messungen: AMAZON-SL mit vorgeschalteter HPLC (Typ Agilent 1100 bestehend aus binärer Pumpe, Degasser und thermostatisierbarem Säulenofen).

Gerät für hochaufgelöste Messungen: MAXIS-4G mit vorgeschalteter HPLC (Typ Agilent 1260 bestehend aus binärer Mikro-Pumpe, Degasser und thermostatisierbarem Säulenofen). Für beide wird eine Injektor MPS3 von *Gerstel* verwendet.

GC/MS-Gerät: Agilent 5973N MSD mit einem Gaschromatographen vom Typ Agilent 6890N.

Die Messungen wurde mit Hilfe von Data AnalysisVersion 4.0 SP5 der Firma *Bruker Daltonik GmbH*, ausgewertet.

### Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Zur Durchführung der Isothermalen Titrationskalorimetrie wurde das VP-ITC Mikrokalorimeter der Firma *MicroCal* verwendet. Das Zellvolumen beträgt hier 1.4514 ml.

Alle Lösemittel wurden vor ihrem Einsatz unter Vakuum entgast und die deweils hergestellten Lösungen noch einmal mit Ultraschall behandelt. Sowohl die Zelle als auch die Spritze wurden vor der Messung mit dem jeweiligen Lösemittel gespült. Als Referenz wurde entgastes Wasser eingesetzt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels ORIGIN 7 mit der ITC-Software der Firma *Microcal*.



### UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden an einem V 660 Spektrometer mit 6-fach Küvettenhalter und einer PAC-743 Temperiereinheit der Firma *Jasco* aufgenommen. Als Hintergrundmessung wurde jeweils eine leere Küvette vermessen und diese automatisch von der folgenden Messung abgezogen. Alle Messungen wurden bei 25 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mM) der Firma *Hellma* durchgeführt.

### Fluoreszenzspektroskopie

Die fluorimetrischen Messungen wurden an einem Cary-Eclipse Spektrometer der Firma *Varian* bei 25 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mM) der Firma *Hellma* durchgeführt.

### Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die AFM-Bilder wurden im Semikontakt-Modus mit einem Innova NanoDrive AFM-Kontroller und einem Innova Raster Kraft Mikroskop der Firma *Veeco* mit N-dotierten Silikon Cantilevern (AC 160TS OLYMPUS) aufgenommen. Die Scan-Rate lag ca. bei 5 µm/s. Die Lösungen wurden für 2 min durch spin-coating (66–120 rps) auf eine frisch abgespaltene Mica-Oberfläche der Firma *Plano* aufgetragen. Die AFM-Daten wurden mit dem Programm Gwyddion analysiert.

### Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die DLS-Messungen wurden an einem Zetasizer „Nano ZS“ der Firma *Malvern* durchgeführt. Die jeweiligen Lösemittel wurden vor Ansatz der Probe filtriert. Alle Messungen wurden bei 25 °C in Quarzglasküvetten (Schichtdicke 10 mM) der Firma *Hellma* durchgeführt und dabei mindestens dreimal wiederholt.

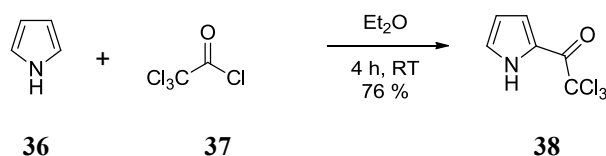
### Kraftfeldrechnungen

Die computergestützten Kraftfeldrechnungen zu den Komplexstrukturen wurden mit dem Programm Maestro Version 9.3 der Firma *Schrödinger* durchgeführt. Dabei wurde das Kraftfeld OPLS\_2005 mit einem GB/SA Solvationsmodell mit Wasser als Lösemittel verwendet. Die für die Konformationssuche verwendete Schrittzahl ist bei der jeweiligen Rechnung angegeben.

## 7.3 SYNTHESSEN

## 7.3.1 Synthese des Guanidiniocarbonylpyrrol-Liganden

Darstellung des 2-(Trichloracetyl)-1*H*-Pyrrols (**38**)<sup>97</sup>



Zu einer Lösung von Trichloroacetylchlorid (**37**) (25.0 ml, 134 mmol, 1.07 Äq.) in abs. Diethylether (22 ml) wurde innerhalb von 3 h Pyrrol (**36**) (8.38 ml, 125 mmol, 1.0 Äq.) zutropft. Die Mischung wurde eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend vorsichtig mit wässriger Kaliumcarbonatlösung (20.0 g, 0.15 mol in 20 ml Wasser) neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und durch Filtration von entstandener Schlacke befreit. Das Filtrat wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel anschließend destillativ im Vakuum entfernt. 2-(Trichloroacetyl)-1*H*-Pyrrol (**38**) (20.1 g, 95 mmol, 76 %) wurde als graubrauner Feststoff isoliert. Diese Reinheit war für die anschließende Synthese ausreichend, weshalb auf eine Umkristallisation verzichtet wurde.

**C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>3</sub>NO**    212.46 g mol<sup>-1</sup>

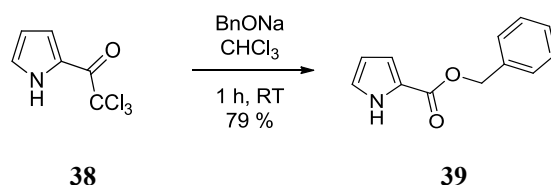
**Ausbeute:**        20.1 g (95 mmol, 76 %, graubrauner Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert:**        0.49 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan)

**Smp.:**            75.5 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:**        **(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 6.40 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.18 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.39 (m, 1H, Pyrrol-CH), 9.50 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

**FT-IR**            **(ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3317 (s), 1649 (s), 1534 (m), 1422 (m), 1382 (m), 1135 (m), 1110 (m), 1063 (m), 1035 (m), 840 (m) cm<sup>-1</sup>.

Darstellung des 1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylesters (**39**)<sup>97</sup>

Zur Herstellung des Natriumbenzylats wurde zunächst Benzylalkohol (20 ml) destilliert und dieser mit Natrium (440 mg, 19.2 mmol) in der Wärme umgesetzt. Im Anschluss wurde 2-(Trichloroacetyl)-1*H*-Pyrrol (**38**) (20.0 g, 94.1 mmol, 1.0 Äq.) in Chloroform (25 ml) gelöst und tropfenweise mit der frisch hergestellten Natriumbenzylat-Lösung (10.8 ml, 105 mmol, 1.12 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde eine Stunde lang bei 25 °C gerührt und anschließend mit 1 N Salzsäure (50 ml) versetzt. Das Lösemittel wurde destillativ im Vakuum entfernt und ein zunächst erhaltenes Öl kristallisierte über Nacht aus. Der Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Essigester/Dichlormethan = 70/15/15) und der 1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**39**) (15.0 g, 74.5 mmol, 79 %) als gelblicher Feststoff isoliert.

**C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>**    201.22 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:**    15.0 g (74.5 mmol, 79 %, gelblicher Feststoff)

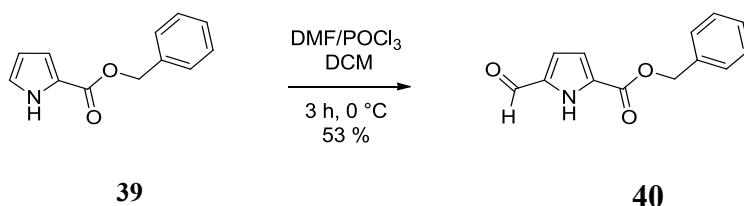
**R<sub>f</sub>-Wert:**    0.55 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Essigester/Dichlormethan = 70/15/15)

**Smp.:**    55.7 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:**    **(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 5.32 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 6.27 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.96 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.39 (m, 5H, Aryl-CH), 9.21 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

**FT-IR**    **(ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3311 (s), 3271 (s), 1669 (m), 1411 (m), 1321 (m), 1183 (m), 1126 (m), 735 (m) cm<sup>-1</sup>.

Darstellung des 5-Formyl-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylesters (**40**)<sup>97</sup>



Zur Generierung des Vilsmeier-Reagenzes wurde Phosphorylchlorid (11.2 ml, 12.0 mmol, 2.0 Äq.) bei 5-10 °C tropfenweise zu abs. Dimethylformamid (23 ml, 0.3 mol, 5.0 Äq.) gegeben und 30 min gerührt. Inzwischen wurde 1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**39**) (12.1 g, 60.1 mol, 1.0 Äq.) in abs. Dichlormethan (250 ml) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Das frisch hergestellte Vilsmeier-Reagenz wurde tropfenweise in einem Zeitraum von 15 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 0 °C und anschließend 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Eine gesättigte Natriumcarbonatlösung (150 ml) wurde zugegeben und 15 min unter Rückfluss erhitzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung (je 50 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Essigester/Dichlormethan = 70/15/15) gereinigt. Es wurde 5-Formyl-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**40**) (7.3 g, 31.8 mmol, 53 %) als gelblicher Feststoff isoliert.

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>**    229.23 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:**    13.8 g (60.3 mmol, 80 %, gelblicher Feststoff)

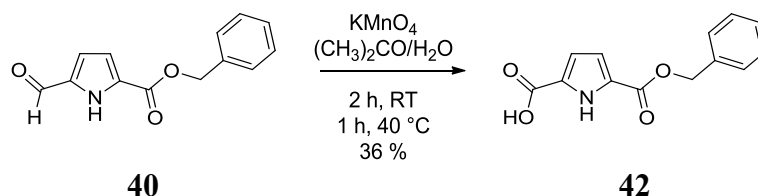
**R<sub>f</sub>-Wert:**    0.55 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Essigester/Dichlormethan = 70/15/15)

**Smp.:**    104.7 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:**    (**300 MHz, CDCl<sub>3</sub>**): δ = 5.39 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 7.00 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.44 (m, 5H, Aryl-CH), 9.69 (s, 1H, Aldehyd-CH), 9.98 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR:**    (**75 MHz, CDCl<sub>3</sub>**): δ = 67.0 (Benzyl-CH<sub>2</sub>), 116.0 (Pyrrol-CH), 119.7 (Pyrrol-CH), 128.5 (Aryl-CH), 128.6 (Aryl-CH), 128.7 (Aryl-CH), 134.5, 135.2 (C<sub>q</sub>), 160.1 (Carbonyl-C<sub>q</sub>), 180.4 (Aldehyd-C<sub>q</sub>) ppm.

**FT-IR**    (**ATR**):  $\tilde{\nu}$  = 3263 (s), 1672 (s), 1548 (m), 1374 (m), 1310 (m), 1222 (s) cm<sup>-1</sup>.

Darstellung des 1*H*-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäure-Monobenzylesters (**42**)

5-Formyl-1*H*-Pyrrol-2-Carbonsäurebenzylester (**40**) (13.5 g, 58.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Aceton (100 ml) gelöst und innerhalb einer Stunde portionsweise kristallines Kaliumpermanganat (19.0 g, 120 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend eine Stunde bei 40 °C und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde Natriumdithionit (1.05 g, 6.00 mmol, 0.10 Äq.) zugegeben und wenige Minuten gerührt. Die Mischung wurde nun mit 5 %iger Natronlauge (120 ml) versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde mit 5 %iger Salzsäure angesäuert. Ein farbloser Niederschlag wurde abfiltriert, mit der 5 %igen Salzsäure gewaschen und über Phosphorpentoxid im Vakuum getrocknet. 1*H*-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäure-Monobenzylester (**42**) (5.20 g, 21.2 mmol, 36 %) wurde als bräunlicher Feststoff isoliert.

**C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>** 245.23 g mol<sup>-1</sup>

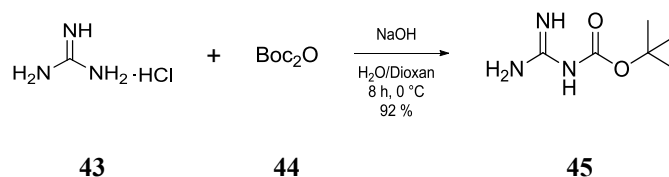
**Ausbeute:** 5.20 g (21.2 mmol, 36 %, bräunlicher Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.59 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Essigester = 1/1 + 1 % Essigsäure).

**Smp.:** 235.2 °C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 5.28 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 6.76 (m, 1H, Pyrrol-CH), 6.84 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.39 (m, 5H, Aryl-CH), 12.54 (s, 1H, Pyrrol-NH), 12.82 (s, 1H, COOH) ppm.

**FT-IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3279 (s), 3650 (s), 1715 (s), 1668 (s), 1553 (s), 1265 (s), 1203 (m) cm<sup>-1</sup>.

Darstellung des *N*-Boc-Guanidins (**45**)

Zu einer Lösung aus Di-*tert*-Butyldicarbonat (12.0 g, 55.0 mmol, 1.0 Äq.) in Dioxan (100 ml) wurde mithilfe eines Präzisionstropftrichters innerhalb von 8 h bei  $0^\circ\text{C}$  eine Mischung aus Guanidiniumchlorid (26.3 g, 275 mmol, 5.0 Äq.) in 6 N Natronlauge (50 ml) zutropft. Die erhaltene Suspension wurde bei Raumtemperatur weitere 20 h gerührt und danach dreimal mit Essigester (je 100 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. *N*-Boc-Guanidin (**45**) (8.02 g, 50.4 mmol, 92 %) wurde als farblos kristalliner Feststoff isoliert.

$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$  159.19  $\text{g mol}^{-1}$

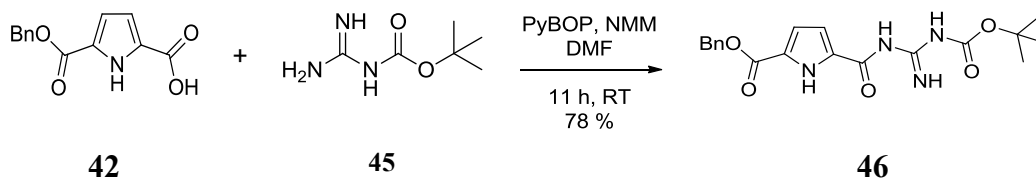
**Ausbeute:** 8.02 g (50.4 mmol, 92 %, farblose Kristalle)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 ( $\text{SiO}_2$ , Dichlormethan/Methanol = 5/1 + 1 % Triethylamin).

**Smp.:**  $165^\circ\text{C}$  (Zersetzung)

**$^1\text{H}$ -NMR:** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 1.34$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 6.82 (br. s, 4H, Gua-NH) ppm.

**$^{13}\text{C}$ -NMR:** (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 28.4$  (*Boc*- $\text{CH}_3$ ), 75.8 (*Boc*- $\text{C}_q$ ), 162.8, 163.4 (*Cq*) ppm.

Darstellung des 1*H*-Pyrrol-5-(*N*-Boc-Guanidinocarbonyl)-2-Carbonsäurebenzylesters (**46**)

Der 1*H*-Pyrrol-2,5-Dicarbonsäure-Monobenzylesters (**42**) (4.00 g, 16.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in abs. Dimethylformamid (40 ml) gelöst und mit PyBOP (9.32 g, 17.9 mmol, 1.10 Äq.) und nmM (4 ml) versetzt. Diese Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit *N*-Boc-Guaninin (**45**) (5.20 g, 32.7 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und die erhaltene Lösung über Nacht gerührt. Dann wurde die Mischung im Eisbad gekühlt und Wasser (25 ml) unter starkem Rühren zugegeben. Es bildete sich ein farbloser Niederschlag, der abfiltriert und mit Wasser gewaschen wurde. Der Niederschlag wurde im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet und 1*H*-Pyrrol-5-(*N*-Boc-Guanidinocarbonyl)-2-Carbonsäurebenzylester (**46**) (4.90 g, 12.7 mmol, 78 %) als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>** 386.40 g mol<sup>-1</sup>

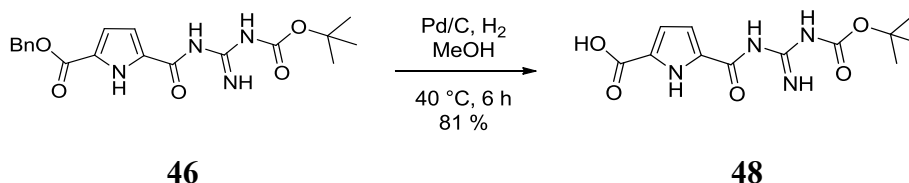
**Ausbeute** 4.90 g (12.7 mmol, 78 %, farbloser Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.51 (SiO<sub>2</sub>, Hexan/Essigester = 3/2 + 1 % Triethylamin).

**Smp.** 88 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1.45 (s, 9H, *Boc*-CH<sub>3</sub>), 5.30 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 6.83 (m, 2H, Pyrrol-CH), 7.30-7.46 (m, 5H, Aryl-CH), 8.56, 9.30, 10.73, 11.61 (br. s, 1H, NH).

Darstellung des 1*H*-Pyrrol-5-(*N*-*boc*-Guanidinocarbonyl)-2-Carbonsäure (**48**)



Der Benzylester **46** (1.79 g, 4.62 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit 10 % Palladium/Aktivkohle (180 mg) in Methanol pa. (50 ml) suspendiert. Unter Einleitung von Wasserstoff wurde 5 h lang bei 40 °C erhitzt. Die erhaltene Lösung wurde über einen Nylon-Filter gegeben und zunächst mit kaltem Methanol gewaschen. Der erhaltene Feststoff wurde in 10 %igem Triethylamin in Methanol gelöst. Die Filtrate wurden vereint und das Lösemittel unter Vakuum abdestilliert. Das erhaltene Öl wurde mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Triethylammoniumsalz des 1*H*-Pyrrol-5-*N*-*Boc*-Guanidinocarbonyl-2-carboxylats (1.63 g, 4.10 mmol, 89 %) wurde als farblosen Feststoff erhalten. Dieser wurde über Nacht in Diethylether suspendiert und gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und nach dem Trocknen 1*H*-Pyrrol-5-(*N*-*Boc*-Guanidinocarbonyl)-2-Carbonsäure (**48**) (1.11 g, 3.74 mmol, 81 %) isoliert.

**C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>** 296.28 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute:** 1.11 g (81 %)

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.64 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol = 8/2 + 1 % Triethylamin)

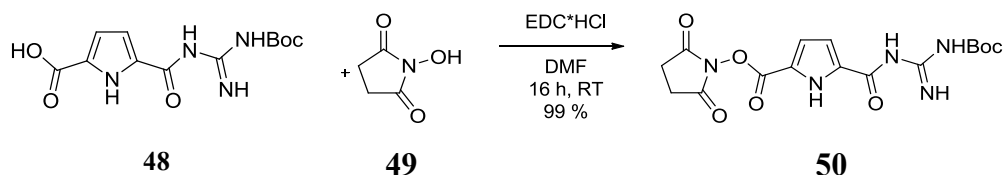
**Smp.:** >308°C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 1.46 (s, 9H, *Boc*-CH<sub>3</sub>), 6.74 (d, <sup>3</sup>*J* = 3.63 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 6.80 (d, <sup>3</sup>*J* = 4.02 Hz, 1H, Pyrrol-CH), 8.58, 9.32, 11.33 (br. s, 1H, NH), 11.77 (br. s, 1H, Pyrrol-NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 27.7 (*Boc*-CH<sub>3</sub>), 81.0 (*Boc*-C<sub>q</sub>), 113.7 (Pyrrol-CH), 115.0 (Pyrrol-CH), 126.1, 132.8, 158.2, 161.4 (C<sub>q</sub>).

**FT-IR:** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2360 (w), 1585 (m), 1319 (s), 1146 (s), 922 (m), 829 (m), 771 (m) cm<sup>-1</sup>.



Synthese des 1*H*-Pyrrol-5-(*N*-*boc*-Guanidinocarbonyl)-2-Hydroxysuccinimidesters (**50**)

1*H*-Pyrrol-5-(*N*-*Boc*-Guanidinocarbonyl)-2-Carbonsäure (**48**) (2.00 g, 6.75 mmol, 1.0 Äq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (**49**) (934 mg, 8.12 mmol, 1.20 Äq.) wurden in abs. Dimethylformamid (51 ml) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Nach 30 min wurde EDC·HCl (1.56 g, 8.11 mmol, 1.20 Äq.) zugegeben. Es wurde 2 h bei 0 °C gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit Essigester (je 50 ml) extrahiert. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernen des Lösemittels unter Vakuum wurde der Succinimidester **50** (2.63, 6.68 mmol, 99 %) als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>** 393.35 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 2.63 g (6.68 mmol, 99 %, farbloser Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.41 (SiO<sub>2</sub>, Essigester/Cyclohexan = 7/3)

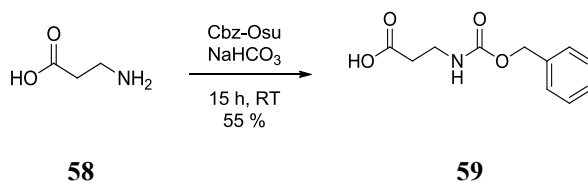
**Smp.** 212 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR** (**300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>**): δ = 1.48 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>), 2.88 (s, 4H, Succinimid-CH<sub>2</sub>), 6.88 (m, 1H, Pyrrol-CH), 7.11 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 4.02, Pyrrol-CH), 8.60, 9.38 (s, 1H, Gua-NH), 10.7 (br. s, 1H, Gua-NH), 12.4 (br. s, 1H, Pyrrol-NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (**75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>**): δ = 25.5 (Succinimid-CH<sub>2</sub>), 27.7 (Boc-CH<sub>3</sub>), 81.7 (Boc-C<sub>q</sub>), 114.1, 118.6 (Pyrrol-CH), 126.0, 127.3, 139.0, 155.3, 158.4 (C<sub>q</sub>), 170.5 (Succinimid- C<sub>q</sub>) ppm.

**FT-IR** (**ATR**):  $\tilde{\nu}$  = 3346 (m), 2986 (w), 1759 (s), 1721 (s), 1625 (s), 1515 (s), 1205 (s), 1135 (s), 1073 (s), 1047 (s), 918 (s).

**HR-MS** (**pos. ESI-ToF**): *m/z* = 394.1357 [M + H]<sup>+</sup>, 416.1176 [M + Na]<sup>+</sup>; berechnet für: [C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 394.1357; [C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>7</sub>]<sup>+</sup>: 416.1177.

Darstellung des CBZ- $\beta$ -Alanin (**59**)

Zu einer Lösung von  $\beta$ -Alanin (**58**) und Natriumhydrogencarbonat in einer Mischung aus Wasser und Aceton (1:1, 10 ml) wurde Z-Osu zugegeben und über Nacht gerührt. Aceton wurde unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase zweimal mit Chloroform gewaschen. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden mit Salzsäure angesäuert und dadurch ein weißer Niederschlag ausgefällt. Dieser wurde abfiltriert, getrocknet und CBZ- $\beta$ -Alanin (**59**) als Öl isoliert (619 mg, 2.77 mmol, 55 %).

**C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>**     223.23 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute**     619 mg (2.77 mmol, 55 %, farbloses Öl)

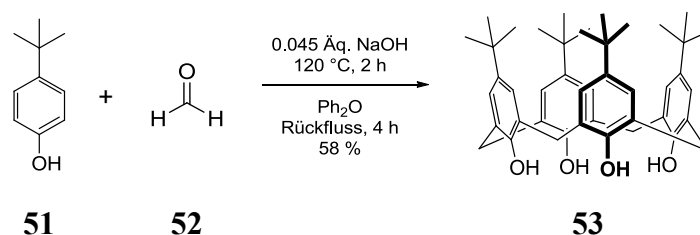
**R<sub>f</sub>-Wert**     0.17 (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Methanol = 9/1)

**<sup>1</sup>H-NMR**     **(300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 2.38 (t, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.22 (q, <sup>3</sup>J = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Bn), 7.34 (s, 5H, Aryl-CH), 12.0 (br. s, 1H, COOH) ppm.

**HR-MS**     **(pos. ESI-ToF):** m/z = 246.07 [M + Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; berechnet für: [C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 246.07.

### 7.3.2 Funktionalisierung des Calix[4]aren-Grundgerüsts am *upper rim*

#### Darstellung des *p*-tert-Butylcalix[4]arens (**53**)

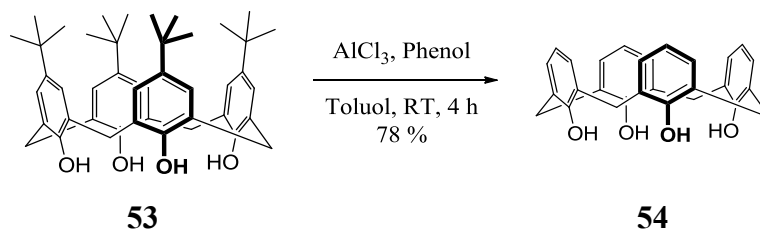


Gemörseretes *p*-tert-Butylphenol (**51**) (30.0 g, 200 mmol, 1.0 Äq.), 37 %ige wässrige Formaldehydlösung **52** (18.6 ml, 249 mmol, 1.20 Äq.), Natriumhydroxid (0.36 g, 8.99 mmol, 0.045 Äq.) und Wasser (1.0 ml) wurden in einem 1-l-Dreihalskolben vorgelegt. Die Reaktionsmischung wurde 15 min bei Raumtemperatur unter Einsatz eines KPG-Rührers vermengt und anschließend für 2 h bei 100-120 °C im Ölbad erhitzt. Über einen Wasserabscheider konnte das entstehende Wasser unter Einleitung eines leichten Argonstroms abgetrennt werden. Dabei nahm die Suspension eine gelbe Färbung an und wurde unter Schaumbildung fest. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit Diphenylether (270 ml) versetzt und eine Stunde gerührt bis der Feststoff nahezu gelöst war. Diese Lösung wurde unter Einleitung eines Argonstroms auf 110-120 °C erhitzt bis keine Wasserabscheidung mehr zu beobachten war. An diesem Punkt wurde die Mischung für 15 min auf 150-160 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 3-4 h unter Rückfluss erhitzt. Dabei nahm die Lösung eine dunkelbraune Färbung an und schäumte gelegentlich stark auf. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit 240 ml Essigester ein beigefarbener Niederschlag ausgefällt. Die Reaktionsmischung wurde weitere 15-30 min gerührt und anschließend über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und nachfolgend zweimal mit Essigester (je 30 ml), einmal mit Eisessig (60 ml), zweimal mit Wasser (je 30 ml) und zweimal mit Aceton (je 12.5 ml) gewaschen. *p*-tert-Butylcalix[4]aren (**53**) (18.9 g, 29.1 mmol, 58 %) wurde als nahezu farblos kristalliner Feststoffe isoliert.

Die Reinheit dieses Feststoffes ist ausreichend für die folgenden Synthesen. Eine Umkristallisation wurde, wenn notwendig, mit Toluol durchgeführt, wobei ein 1:1-Komplex mit Toluol entstand und eine anschließende Entfernung des Toluols schwierig war. Durch Entfernung des Lösemittels im Vakuum wurden **53** als Toluoleinschluss (17.4 g, 23.5 mmol, 47 %) erhalten.

<b>C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>O<sub>4</sub></b>	648.91 g mol <sup>-1</sup>
<b>Ausbeute:</b>	17.1 g (26.3 mmol, 63 %, farblos kristalliner Feststoff)
<b>R<sub>f</sub>-Wert:</b>	0.32 (SiO <sub>2</sub> , Chloroform/Cyclohexan = 6/4)
<b>Smp.:</b>	343 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR:</b>	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 1.21 (s, 36H, <i>tert</i> -Butyl-CH <sub>3</sub> ), 3.52 (d, <sup>3</sup> J = 7.2 Hz, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 4.23 (d, <sup>3</sup> J = 7.2 Hz, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 7.05 (s, 8H, Aryl-CH), 10.34 (s, 4H, OH) ppm.
<b><sup>13</sup>C-NMR:</b>	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 31.6 (ArCH <sub>2</sub> Ar), 34.1 ( <i>tert</i> -Butyl-C <sub>q</sub> ), 126.1 (Aryl-CH), 127.9 (Aryl-C <sub>q</sub> OH) ppm.
<b>FT-IR:</b>	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 3160 (m), 2951 (m), 1738 (m), 1593 (m), 1463 (s), 1448 (s), 1361 (m), 1298 (m), 1240 (s), 1199 (s), 1038 (m), 781 (s), 747 (s) cm <sup>-1</sup> .
<b>HR-MS:</b>	(neg. ESI-ToF): m/z = 647.4142 [M - H <sup>+</sup> ] <sup>-</sup> ; berechnet für: [C <sub>44</sub> H <sub>55</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> : 647.4106.

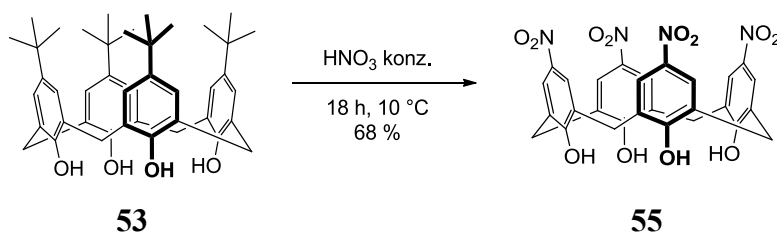
#### Darstellung des Calix[4]arens (**54**)<sup>127</sup>



In Toluol pa. (160 ml) wurde *p-tert*-Butylcalix[4]aren (**53**) (15.0 g, 23.1 mmol, 1.0 Äq.) suspendiert und mit Phenol (10.1 g, 108 mmol, 4.68 Äq.) versetzt. Es folgte eine portionsweise Zugabe von Aluminiumtrichlorid (30.72 g, 203 mmol, 8.79 Äq.) bei Raumtemperatur. Die Reaktionsmischung wurde 6 h gerührt. Die nun dunkle Lösung wurde unter Eiskühlung mit 1N HCl (400 ml) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige zweimal mit Toluol (je 100 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und bis auf einen kleinen Rückstand eingeeengt. Dieser wurde mit Methanol versetzt und ein entstandener weißer Feststoff abfiltriert. Zur Umkristallisation wurde der Feststoff in heißem Chloroform gelöst, auf Raumtemperatur gebracht und mit Methanol unterschichtet, um einen farblosen Niederschlag auszufällen. Das Produkt **54** wurde unter Vakuum getrocknet und Calix[4]aren (**54**) (7.64 g, 18.0 mmol, 78 %) als farbloser Feststoff isoliert.

<b>C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub></b>	424.49 g mol <sup>-1</sup>
<b>Ausbeute</b>	7.64 g (18.0 mmol, 78 %, farbloser feinkristalliner Feststoff)
<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	0.35 (SiO <sub>2</sub> , Essigester/Cyclohexan = 1/9 + 0.1 % TFA)
<b>Smp.</b>	310 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	<b>(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 3.56 (br. s, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 4.26 (br. s, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 6.73 (t, <sup>3</sup> J = 10.0 Hz, 4H, Aryl-CH), 7.06 (d, <sup>3</sup> J = 10.0 Hz, 8H, Aryl-CH), 10.2 (s, 4H, ArOH) ppm.
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	<b>(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 31.9 (ArCH <sub>2</sub> Ar), 122.4 (Aryl-CH), 128.4 (Aryl-C <sub>q</sub> ), 129.1 (Aryl-CH), 148.9 (Aryl-C <sub>q</sub> OH) ppm.
<b>FT-IR</b>	<b>(ATR):</b> $\tilde{\nu}$ = 3135 (m), 1593 (m), 1464 (s), 1447 (s), 1412 (m), 1242 (m), 1197 (m), 1077 (m), 899 (m), 834 (m), 748 (s) cm <sup>-1</sup> .
<b>HR-MS</b>	<b>(pos. ESI-ToF):</b> m/z = 447.1587 [M + Na <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> ; berechnet für: [C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> NaO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> : 447.1567.

### Darstellung des 5,11,17,23-Tetranitrocalix[4]arens (**55**)<sup>102</sup>

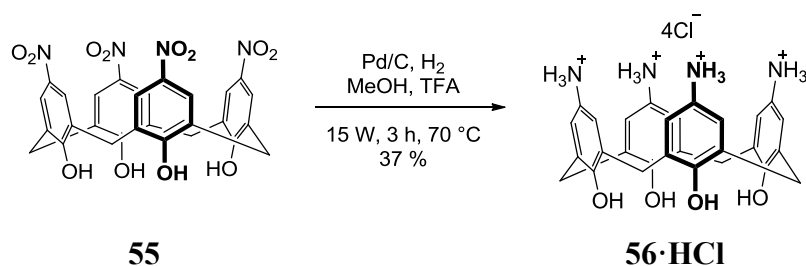


*p*-tert-Butylcalix[4]aren (**53**) (3.00 g, 4.62 mmol, 1.0 Äq.) wurde in konz. Salpetersäure (60 ml) suspendiert und 18 h bei 10 °C gerührt. Zu dieser orangen Suspension wurde Wasser (250 ml) gegeben, der entstandene Niederschlag filtriert und mit Wasser (100 ml) gewaschen. Der sehr feine Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet und 5,11,17,23-Tetranitrocalix[4]arens (**55**) (2.01 g, 3.33 mmol, 68 %) als hellgelber Feststoff isoliert.

<b>C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub></b>	604.48 g mol <sup>-1</sup>
<b>Ausbeute</b>	2.01 g (3.33 mmol, 68 %, hellgelber Feststoff)
<b>R<sub>f</sub></b>	0.54 (SiO <sub>2</sub> , Isopropanol/Cyclohexan = 9/1 + 0.1 % TFA)
<b>Schmp.</b>	> 340 °C (Zersetzung)

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	<b>(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 3.72 (br. s, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 4.19 (br. s, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 8.15 (s, 8H, Aryl-CH) ppm.
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	<b>(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ = 30.5 (ArCH <sub>2</sub> Ar), 124.6 (Aryl-CH), 129.5 (Aryl-C <sub>q</sub> ), 138.2 (ArC <sub>q</sub> NO <sub>2</sub> ), 162.4 (Aryl-C <sub>q</sub> OH).
<b>FT-IR</b>	<b>(ATR):</b> $\tilde{\nu}$ = 2925 (m), 1473 (s), 1197 (s), 1117 (s), 1025 (s), 849 (m), 621 (w) cm <sup>-1</sup> .
<b>HR-MS</b>	<b>(neg. ESI-ToF):</b> m/z = 603.1067 [M - H] <sup>+</sup> ; berechnet für: [C <sub>28</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub> ] <sup>-</sup> : 603.0994.

### Darstellung des 5,11,17,23-Tetraaminocalix[4]aren-Hydrochlorids (**56·HCl**)



Das 5,11,17,23-Tetranitrocalix[4]aren (**55**) (100 mg, 0.166 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Ethanol (6 ml) suspendiert und unter Argon mit Trifluoressigsäure (49 µl, 4.0 Äq.) und 10 % Palladium/Aktivkohle (40 mg) versetzt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bei 15 W und 70 °C unter Einleitung von Wasserstoff 3 h gerührt. Die Suspension wurde filtriert und mit einer Mischung aus Wasser/Ethanol (1:1) gewaschen, das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Es wurde ein bräunlicher Feststoff (124 mg) erhalten, welcher säulenchromatographisch an der MPLC (RP18, 50 g, 25 ml/min, 20 % - 60 % MeOH/0.05 % TFA in 60 min) gereinigt wurde, um **56·HCl** (30.0 mg, 61.96 µMol, 37 %) als farblosen Feststoff zu isolieren.

**C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>** 630.39 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 30 mg (61.96 µMol, 37 %, farbloser Feststoff)

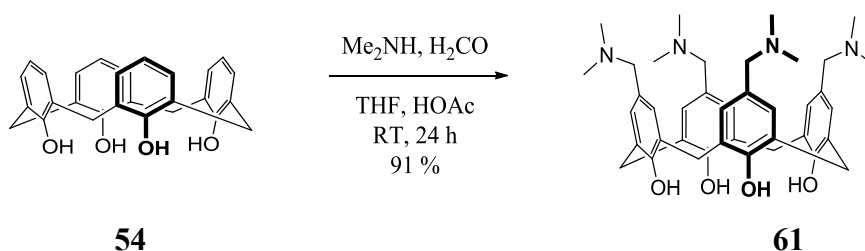
**HPLC**  $r_t$  = 11.71 min (Gradient: 20 min, 20 % - 70 % MeOH + 0.05 % TFA, UV<sub>max</sub> = 282.4, 88 % Reinheit bei 290 nm)

**Smp.** >146 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR** **(300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 3.58 (br. s, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.86 (s, 8H, Aryl-CH), 9. (br. s, 4H, OH) ppm.

<b><math>^{13}\text{C}</math>-NMR</b>	<b>(75 MHz, DMSO-<math>d_6</math>):</b> $\delta$ = 31.9 (ArCH <sub>2</sub> Ar), 122.1 (Aryl-CH), 130.6, 154.4 (Aryl-C <sub>q</sub> ) ppm.
<b>FT-IR</b>	<b>(ATR):</b> $\tilde{\nu}$ = 2869 (bw), 2624 (bw), 1663 (s), 1476 (m), 1183 (s), 1126 (s), 839 (m), 797 (m), 722 (w), 644 (w), 627 (w), 612 (w) cm <sup>-1</sup> .
<b>HR-MS</b>	<b>(pos. ESI-ToF):</b> $m/z$ = 485.2195 [M + H] <sup>+</sup> , 969.4288 [2M + H] <sup>+</sup> ; berechnet für: [C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> : 485.2183, [C <sub>56</sub> H <sub>57</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> ] <sup>+</sup> : 969.4294.

Darstellung des 5,11,17,23-Tetrakis(dimethylamino-methyl)-Calix[4]arens (**61**)<sup>104</sup>



Zu einer Lösung des Calix[4]arens (**54**) (2.00 g, 4.71 mmol, 1.0 Äq.) in Tetrahydrofuran (60 ml) wurde Eisessig (6.8 ml, 20.5 Äq.), 40 %iges wässriges Dimethylamin (3.0 ml, 23.8 mmol, 5.06 Äq.) und 37 %ige wässrige Formaldehydlösung (1.78 ml, 23.8 mmol, 5.06 Äq.) gegeben. Diese Reaktionsmischung wurde 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösemittel wurden anschließend im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mit Wasser (50 ml) versetzt. Die wässrige Lösung wurde zweimal mit Diethylether (je 50 ml) extrahiert und mit 10 %iger Kaliumcarbonatlösung neutralisiert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Produkt im Vakuum getrocknet um Tetrakis(dimethylamino-methyl)-Calix[4]aren (**61**) (2.80 g, 4.29 mmol, 91 %) als farblosen Feststoff zu erhalten.

**C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>** 652.87 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 2.80 g (4.29 mmol, 91 %, farbloser Feststoff)

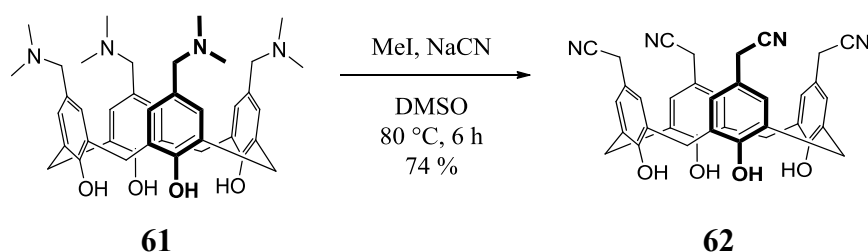
**R<sub>f</sub>-Wert** 0.63 (SiO<sub>2</sub>, Essigester)

**Smp.** 158-159 °C

**$^1\text{H}$ -NMR** **(300 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 2.11 (s, 24H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.13 (m, 12H, ArCH<sub>2</sub>Ar, ArCH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.26 (d, <sup>3</sup>J = 5.3 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.80 (s, 8H, Aryl-CH) ppm.

<b><math>^{13}\text{C}</math>-NMR</b>	<b>(75 MHz, DMSO-<math>d_6</math>):</b> $\delta$ = 32.6 (ArCH <sub>2</sub> Ar), 44.1 (ArCH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 62.6 (ArCH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ), 125.4 (Aryl-C <sub>q</sub> ), 128.6 (Aryl-CH), 130.1, 154.4 (Aryl-C <sub>q</sub> ) ppm.
<b>FT-IR</b>	<b>(ATR):</b> $\tilde{\nu}$ = 3250 (s), 2940 (m), 2862 (m), 2820 (m), 2774 (m), 1556 (w), 1471 (s), 1454 (s), 1410 (s), 1361 (s), 1300 (s), 1280 (s), 1252 (m), 1151 (m), 1019 (m), 792 (s) cm <sup>-1</sup> .
<b>HR-MS</b>	<b>(pos. ESI-ToF):</b> $m/z$ = 653.4086 [M + H] <sup>+</sup> ; berechnet für: [C <sub>40</sub> H <sub>53</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> : 653.4061.

Darstellung des 5,11,17,23-Tetra(cyanomethyl)-Calix[4]arens (**62**)<sup>104</sup>



Das Tetrakis(dimethylamino-methyl)-Calix[4]aren (**61**) (1.54 g, 2.36 mmol, 1.0 Äq.) wurde in abs. DMSO (25 ml) gelöst und tropfenweise mit Methyljodid (885  $\mu\text{l}$ , 14 mmol, 5.93 Äq.) versetzt. Es wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend Natriumcyanid (1.39 g, 28 mmol, 11.9 Äq.) zugegeben. Diese Mischung wurde 6 h auf 80 °C erhitzt und schließlich auf Eiswasser (100 ml) gegeben, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Dieser wurde sorgsam mit Wasser gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet und das 5,11,17,23-Tetra(cyanomethyl)-calix[4]aren (**62**) (1.01 g, 1.74 mmol, 74 %) isoliert.

**C<sub>36</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>** 580.63 gmol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 1.01 g (1.74 mmol, 74 %, leicht gelblicher Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.22 (SiO<sub>2</sub>, Essigester/Cyclohexan = 1:1)

**Smp.** > 410 °C (> 220 °C farblich Veränderung)

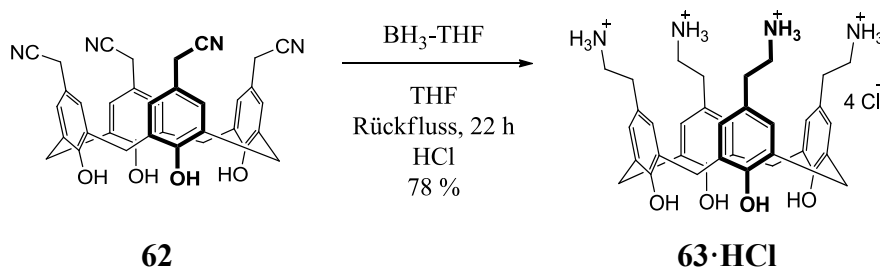
**$^1\text{H}$ -NMR** **(300 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 3.66 (s, 8H, ArCH<sub>2</sub>CN), 3.06 (br. s, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.26 (br. s, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.87 (s, 8H, Aryl-CH), 12.9 (br. s, 4H, ArOH) ppm.

**$^{13}\text{C}$ -NMR** **(75 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 21.6 (CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>CN), 32.2 (CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>Ar), 119.4, 119.7 (C<sub>q</sub>, Aryl-C<sub>q</sub>), 127.3 (CH, Aryl-CH), 130.6 (C<sub>q</sub>, CN), 154.3 (C<sub>q</sub>, ArOH) ppm.



<b>FT-IR</b>	<b>(ATR):</b> $\tilde{\nu}$ = 3141 (m), 1468 (s), 1413 (m), 1227 (s), 1151 (m), 848 (m), 783 (m), 750 (m), 652 (m) $\text{cm}^{-1}$ .
<b>HR-MS</b>	<b>(pos. ESI-ToF):</b> $m/z$ = 603.2023 $[\text{M} + \text{Na}^+]^+$ ; berechnet für: $[\text{C}_{36}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{NaO}_4]^+$ : 603.2003.

Synthese des 5,11,17,23-Tetra(2-aminoethyl)-calix[4]aren-hydrochlorids (**63·HCl**)<sup>104</sup>



In abs. Tetrahydrofuran (50 ml) wurde 5,11,17,23-Tetra(cyanomethyl)-calix[4]aren (**62**) (1.45 g, 2.49 mmol, 1.0 Äq.) suspendiert und tropfenweise über 20 min mit 1 M Boran-Tetrahydrofuran-Komplex-Lösung (50 ml) versetzt. Die Lösung wurde unter Argon 8 h unter Rückfluss erhitzt, wobei sich das Edukt vollständig löste. Dann wurden noch weitere 30 ml der 1 M Boran-Tetrahydrofuran-Komplex-Lösung hinzugegeben und für weitere 14 h erhitzt. Das Lösemittel wurde destillativ im Vakuum entfernt und der Rückstand mit einer Mischung aus Wasser/Methanol/konz. Salzsäure (1/5/1, 140 ml) eine Stunde lang unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wurde destillativ im Vakuum entfernt und der verbliebene Rückstand mit Aceton (200 ml) versetzt. Der hierbei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Hierbei wurde 5,11,17,23-Tetra(2-aminoethyl)-Calix[4]aren Hydrochlorid (**63**) (1.58 g, 1.94 mmol, 78 %) als farbloser Feststoff isoliert, bei welchem es sich jedoch um eine Einschlussverbindung mit 0.75 Äquivalenten Tetrahydrofuran handelte.

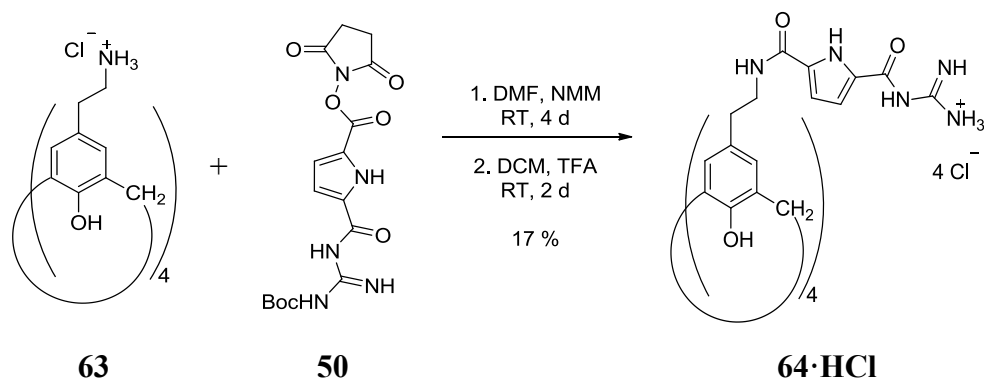
**C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>** 742.60  $\text{g mol}^{-1}$

Inklusive 0.75 Äq. THF: 796.68  $\text{g mol}^{-1}$

<b>Ausbeute</b>	1.58 g (1.98 mmol, 78 %, farbloser Feststoffes mit Tetrahydrofuran-Einschluss)
<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	0.02 (SiO <sub>2</sub> , CHCl <sub>3</sub> /MeOH = 9/1 + 0.1 % TFA)
<b>HPLC</b>	$t_r$ = 4.91 min (Gradient: 15 min, 30 % - 100 % MeOH, $\text{UV}_{\text{max}}$ = 279)
<b>Smp.</b>	239 °C Zersetzung

<b><math>^1\text{H}</math>-NMR</b>	<b>(300 MHz, DMSO-<math>d_6</math>):</b> $\delta$ = 1.42 (m, THF- $\text{CH}_2$ ), 2.67 (m, 8H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.91 (m, 8H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.38 (m, THF- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.04 (s, 8, Aryl- $\text{CH}$ ), 8.16 (br. s, 12H, $\text{NH}_3\text{Cl}$ ), 9.79 (br. s, 4H, OH). <b>(300 MHz, <math>\text{D}_2\text{O}</math>):</b> $\delta$ = 1.54 (m, THF- $\text{CH}_2$ ), 2.77 (t, $^3J$ = 6.0 Hz, 8H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.15 (t, $^3J$ = 6.0 Hz, 8H, $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.57 (m, THF- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.93 (br s, 8H, $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ), 7.08 (s, 8, Aryl- $\text{CH}$ ).
<b><math>^{13}\text{C}</math>-NMR</b>	<b>(75 MHz, <math>\text{D}_2\text{O}</math>):</b> $\delta$ = 30.6 ( $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ), 31.9 ( $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 40.6 ( $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 129.2 (Aryl- $\text{CH}$ ), 129.3, 130.1 (Aryl- $\text{C}_q$ ), 148.3 ( $\text{C}_q$ , ArOH) ppm.
<b>FT-IR</b>	<b>(ATR):</b> $\tilde{\nu}$ = 2932 (s), 1604 (m), 1461 (s), 1384 (m), 1226 (m), 1042 (m), 872 (m), 809 (m), 783 (m), 669 (m) $\text{cm}^{-1}$ .
<b>HR-MS</b>	<b>(pos. ESI-ToF):</b> $m/z$ = 597.3374 [ $\text{M} + \text{H}^+$ ] $^+$ ; berechnet für: $[\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_4]^+$ : 597.3435.

Kupplung und Entschützung zum 5,11,17,23-Tetrakis(GCP-2-amidoethyl)-Calix[4]arenhydrochlorid (**64·HCl**)

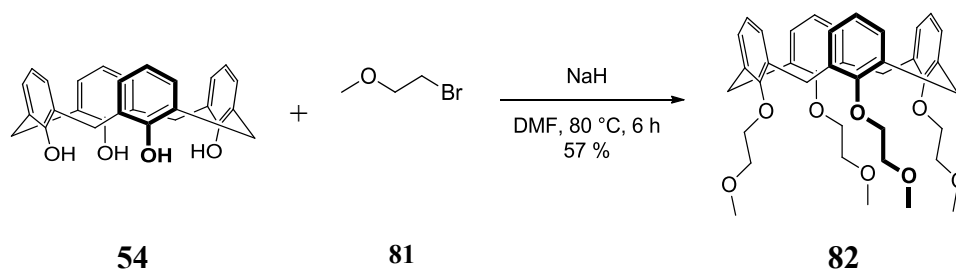


Das Hydrochlorid **63** (89.0 mg, 0.1198 mmol, 1.0 Äq.) wurde in abs. Dimethylformamid (5 ml) gelöst und mit NMM (53 µl, 0.479 mmol, 4.0 Äq) auf 0 °C gekühlt. Nach 2 h wurde der Succinimidester **50** (236 mg, 0.599 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben und diese Reaktionsmischung vier Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und ein erhaltener Rückstand mit Wasser versetzt. Es bildete sich ein Niederschlag, welcher abfiltriert wurde. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO<sub>2</sub>, Dichlormethan/Cyclohexan/Methanol = 5/4/1). Es wurden 126 mg eines gelblichen Feststoffes isoliert, welcher jedoch nach HPLC-Analyse noch erhebliche Verunreinigungen enthielt. Aufgrund der geringen Menge wurde dieses Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung für die darauffolgende Entschützung eingesetzt. Das Rohprodukt wurde in Dichlormethan (5 ml) gelöst und unter Rühren im Eisbad mit Trifluoressigsäure (15 ml) versetzt. Nach zwei Tagen wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand lyophilisiert. Eine Reinigung an der MPLC (RP18, Gradient, Wasser/Methanol/0.05 % TFA und anschließende Umsalzung mit Salzsäure erbrachte das Produkt (**64·HCl**) als Chloridsalz (29.4 mg, 20.2 µMol, 17 %).

*Boc*-geschütztes Rohprodukt**C<sub>84</sub>H<sub>100</sub>N<sub>20</sub>O<sub>20</sub>** 1709.81 g mol<sup>-1</sup>**R<sub>f</sub>-Wert** 0.67 (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Dichlormethan/Methanol = 1:8:1)**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.45 (s, 36H, *Boc*-CH<sub>3</sub>), 2.54 (m, 8H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.18 (br. s, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.75 – 6.94 (m, 16H, Pyrrol-CH, Aryl-C), 8.38, 8.58, 9.33 (OH, NH) ppm. (fehlende Signale unter H<sub>2</sub>O-Peak)**64·HCl****C<sub>64</sub>H<sub>72</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>** 1455.20 g mol<sup>-1</sup>**Ausbeute** 29.4 mg (20.2 μMol, 17 %, leicht gelblicher Feststoff)**HPLC** r<sub>t</sub> = 7.79 min (Isokratisch: 66 % MeOH + 0.05 % TFA, 94 % Reinheit bei 290 nm)**Smp.** > 271 °C (Zersetzung)**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 373 K): δ = 2.63 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 8H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.41 (q, <sup>3</sup>J = 6.75 Hz, 8H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.38 (s, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.84 (d, <sup>3</sup>J = 4.0 Hz, 4H, Pyrrol-CH), 6.97 (s, 8H, Aryl-CH), 7.39 (d, <sup>3</sup>J = 4.05 Hz, 4H, Pyrrol-CH), 8.27 (t, <sup>3</sup>J = 5.4, 4H, Amid-NH), 8.37 (br. s, 16H, Guanidinium-NH), 11.91 (br. s, Amid-NH, Pyrrol-NH) ppm.(500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, 298 K): δ = 2.57 (t, <sup>3</sup>J = 7.15 Hz, 8H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(GCP)), unter Wasserpeak (8H, Ar-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(GCP)), 4.19 (s, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar, restl. unter Wasserpeak), 6.84 (m, 4H, Pyrrol-CH), 6.96 (s, 8H, Ar-CH), 7.41 (m, 4H, Pyrrol-CH), 8.39 (m, 16H, Guanidinium-NH), 8.52 (t, <sup>3</sup>J = 5.4, 4H, Amid-NH), 9.91 (br. s, 4H, ArOH), 11.79 (s, 4H, Gua-CONH), 12.29 (s, 4H, Pyrrol-NH) ppm.**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 31.4 (CH, ArCH<sub>2</sub>Ar), 34.9 (CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Amid), 41.0 (CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Amid), 112.8, 116.3 (CH, Pyrrol-CH), 125.8 (C<sub>q</sub>), 129.1 (CH, Aryl-CH), 132.2, 133.3, 155.8, 159.5, 160.1 (C<sub>q</sub>) ppm.**FT-IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3115 (br. s), 1687 (s), 1629 (m), 1557 (s), 1470 (s), 1278 (s), 1191 (s), 1059 (w), 852 (w), 807 (m), 750 (s) cm<sup>-1</sup>.**HR-MS** (pos. ESI-ToF): m/z = 1309.5269 [M + H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>, 655.2687 [M + 2H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup>, 437.1816 [M + 3H<sup>+</sup>]<sup>3+</sup>; berechnet für: [C<sub>64</sub>H<sub>69</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>]<sup>+</sup>: 1309.5398, [C<sub>64</sub>H<sub>70</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>]<sup>2+</sup>: 655.2736, [C<sub>64</sub>H<sub>71</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>]<sup>3+</sup>: 437.1848.

### 7.3.3 Funktionalisierung des Calix[4]aren-Grundgerüsts am *lower rim*

#### Synthese von 25,26,27,28-Tetra(methoxyethyl)-Calix[4]aren (**82**)



Calix[4]aren (**54**) (3.00 g, 7.07 mmol, 1.0 Äq.) wurden unter Argon in abs. Dimethylformamid (141 ml) gelöst und mit 60 %iger Natriumhydrid-Suspension (2.26 g, 56.5 mmol, 8.00 Äq.) versetzt. Diese Mischung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 1-Brom-2-methoxyethan (5.31 ml, 56.5 mmol, 8.00 Äq.) versetzt. Es wurde 6 h bei 80 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser (100 ml) versetzt und mit Essigester (100 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und noch zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung (je 100 ml) und zuletzt Wasser (100 ml) gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch ( $\text{SiO}_2$ , Essigester/Cyclohexan = 3/7) gereinigt und 25,26,27,28-Tetramethoxyethyl-Calix[4]aren (**28**) als farblose Kristalle (2.64 g, 4.02 mmol, 57 %) isoliert.

**C<sub>40</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>** 656.33 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 2.64 g (4.02 mmol, 57 %, farbloser kristalliner Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.57 ( $\text{SiO}_2$ , Essigester/Cyclohexan = 1/1)

**Smp.** 122 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 3.18 (d, 4H,  $^3J$  = 13.6 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.42 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.83 (t, 8H,  $^3J$  = 6.00 Hz, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.11 (t, 8H,  $^3J$  = 6.00 Hz, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.47 (d, 4H,  $^3J$  = 13.2 Hz, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.60 (m, 12H, Aryl-CH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 30.9 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 58.8 (OCH<sub>3</sub>), 72.0 (ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 73.1 (ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 122.4 (Aryl-CH), 128.4 (Aryl-CH), 135.1, 156.4 (Aryl-C<sub>q</sub>) ppm.

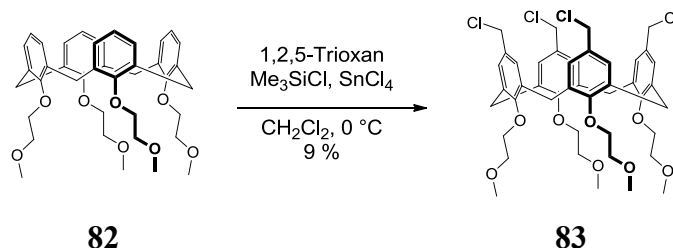
**FT-IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2920 (m), 2813 (m), 1585 (m), 1461 (s), 1446 (s), 1364 (m), 1330 (w), 1294 (m), 1246 (s), 1211 (s), 1193 (s), 1123 (s), 1088 (s), 1055 (s), 1036 (s), 959 (m), 914 (m), 894 (m), 866 (m), 835 (m), 776 (m), 761 (s)

cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS** (pos. ESI-ToF):  $m/z = 679.3315$  [ $M + Na^+$ ]<sup>+</sup>; berechnet für:  $[C_{40}H_{48}NaO_8]^+$ : 679.3315.

Synthese von 5,11,17,23-Tetra(chlormethyl)-25,26,27,28-Tetra(methoxyethyl)-Calix[4]aren

**(83)**<sup>128</sup>



1,2,5-Trioxan (550 mg, 6.11 mmol, 8.0 Äq.) und Trimethylchlorsilan (775 µl, 667 mg, 6.13 mmol, 8.10 Äq.) wurden in abs. Chloroform (50 ml) gelöst und 5 min bei 0 °C gerührt. Das Edukt **82** (500 mg, 0.76 mmol, 1.0 Äq.) wurde zugegeben und Zinn(IV)chlorid (715 µl, 6.11 mmol, 8.0 Äq.) nach weiteren 10 min bei 0 °C ergänzt. Die Reaktionsmischung wurde innerhalb von 17 h auf Raumtemperatur gebracht und schließlich mit 10 %iger Salzsäure (100 ml) beendet. Die Suspension wurde mit Chloroform (100 ml) versetzt und die organische Phase von der wässrigen getrennt, diese wurde einmal mit Wasser (100 ml) gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösemittels unter Vakuum wurde ein gelbes Öl (553 mg) erhalten. Dieses wurde säulenchromatographisch (SiO<sub>2</sub>, Essigester/Cyclohexan = 4/6) gereinigt und das Produkt **83** (60 mg, 70.5 µMol, 9 %) als farblos kristallinen Feststoff isoliert.

**C<sub>44</sub>H<sub>52</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>8</sub>** 850.69 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 60 mg (0.0705 mmol, 9 %, farbloser kristalliner Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.32 (SiO<sub>2</sub>, Essigester/Cyclohexan = 1/1)

**Smp.** 143 °C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.14 (d, <sup>3</sup>J = 13.56 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.40 (s, 12H, OCH<sub>3</sub>), 3.79 (t, <sup>3</sup>J = 8.00 Hz, 8H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.11 (t, <sup>3</sup>J = 8.00 Hz, 8H, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.30 (s, 8H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.48 (d, <sup>3</sup>J = 13.89 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.67 (s, 8H, Aryl-H) ppm.

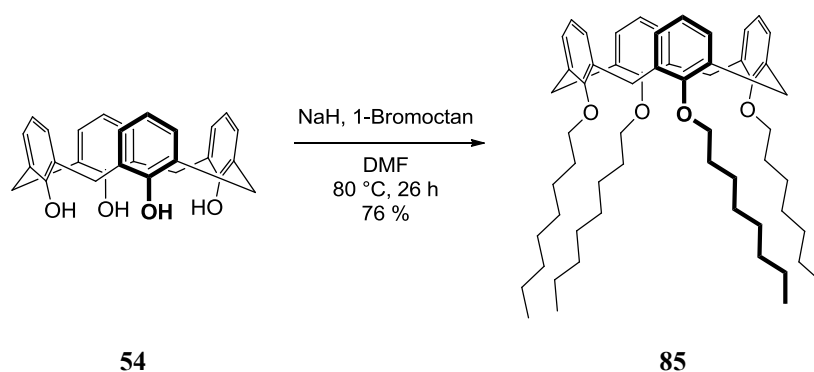
**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 30.8 (CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>Ar), 46.6 (CH<sub>2</sub>, ArCH<sub>2</sub>Cl), 58.8 (CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>), 71.9 (CH<sub>2</sub>, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 73.4 (CH<sub>2</sub>, ArOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 128.8

(CH, Aryl-CH), 131.5, 135.2, 156.6 (C<sub>q</sub>, Aryl-C<sub>q</sub>) ppm.

**FT-IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2919 (s), 2873 (s), 2815 (s), 1735 (w), 1604 (w), 1473 (s), 1453 (s), 1365 (w), 1299 (s), 1257 (s), 1217 (s), 1119 (s), 1095 (m), 1021 (s), 957 (w), 920 (w), 799 (m), 671 (s) cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS** (pos. ESI-ToF):  $m/z$  = 871.2405 [M + Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; berechnet für: [C<sub>44</sub>H<sub>52</sub>Cl<sub>4</sub>NaO<sub>8</sub>]<sup>+</sup>: 871.2309.

### Darstellung des 25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]arens (**85**)<sup>121</sup>



Calix[4]aren (**54**) (7.57 g, 17.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Argon in abs. Dimethylformamid (120 ml) gelöst und mit 60 %iger Natriumhydrid Suspension (5.21 g, 217 mmol, 12.2 Äq.) versetzt. Es wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 1-Bromooctan (27.8 g, 25.0 mL, 144 mmol, 8.06 Äq.) tropfenweise zugegeben. Diese Mischung wurde für 26 h bei 80 °C gerührt und verfärbte sich dabei dunkel. Um die Reaktion zu beenden wurde Eiswasser hinzugefügt und 45 min gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit Chloroform (je 50.0 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser (je 30.0 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde destillativ unter Vakuum entfernt und ein oranges Öl erhalten. Zur Reinigung wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt (SiO<sub>2</sub>, Cyclohexan/Chloroform = 10/1) und der Octylether **85** (11.8 g, 13.6 mmol, 76 %) als wachsartiger Feststoff isoliert.

**C<sub>60</sub>H<sub>88</sub>O<sub>4</sub>** 873.34 g mol<sup>-1</sup>

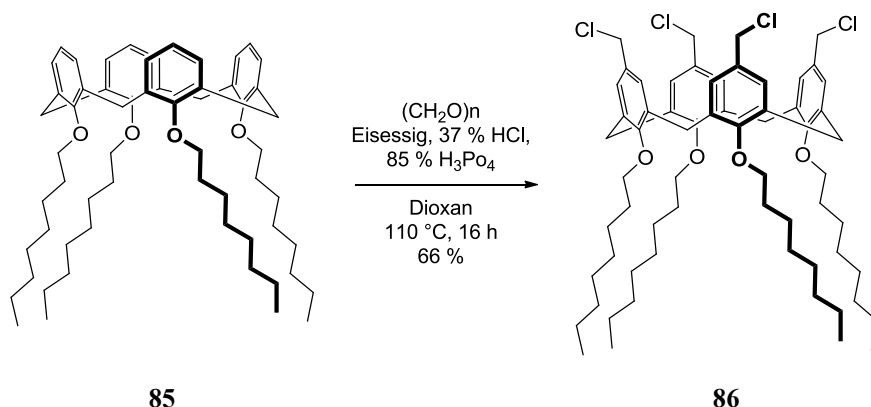
**Ausbeute** 11.8 g (13.6 mmol, 76 %, wachsartiger Feststoff)

**R<sub>f</sub>-Wert** 0.74 (SiO<sub>2</sub>, Essigester/Cyclohexan = 1/1)

**Smp.** 76 °C

- <sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.82-0.96 (m, 12H, CH<sub>3</sub>), 1.20-1.45 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1.83-1.99 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>), 3.14 (d, <sup>3</sup>J = 13.5 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.88 (t, <sup>3</sup>J = 7.49 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>), 4.42 (d, <sup>3</sup>J = 13.4 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.52-6.63 (m, 12H, Aryl-CH) ppm.
- <sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 14.7 (CH<sub>3</sub>), 23.3, 27.0, 30.2, 31.0, 31.6, 32.6 (CH<sub>2</sub>), 75.7 (OCH<sub>2</sub>), 122.4, 128.7 (Aryl-CH), 135.7 (Aryl-C<sub>q</sub>), 135.7 (Aryl-C<sub>q</sub>OOct.) ppm.
- FT-IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2956 (m), 2920 (s), 2852 (s), 1585 (w), 1456 (s), 1379 (m), 1291 (m), 1245 (m), 1209 (m), 1193 (s), 1089 (s), 1015 (m), 911 (w), 760 (s), 722 (w), 629 (m) cm<sup>-1</sup>.
- HR-MS** (pos. ESI-ToF): m/z = 895.6578 [M + Na]<sup>+</sup>, 911.6319 [M + K]<sup>+</sup>; berechnet für: [C<sub>60</sub>H<sub>88</sub>O<sub>4</sub>Na]<sup>+</sup>: 895.6575, [C<sub>60</sub>H<sub>88</sub>O<sub>4</sub>K]<sup>+</sup>: 911.6314.

Darstellung des 5,11,17,23-Tetra(chlormethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]arens (86)<sup>123</sup>



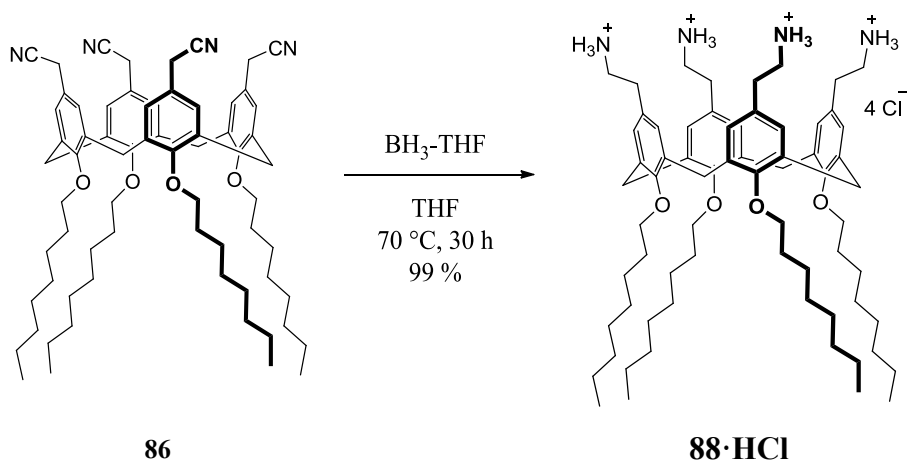
Der Octylether **85** (5.04 g, 5.77 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dioxan (760ml) suspendiert und mit Paraformaldehyd (4.32 g, 1.44 mol) versetzt. Zu dieser Suspension wurden Eisessig (75 ml), 37 %ige Salzsäure (150 ml) und 85 %ige Phosphorsäure (110 ml) getropft und über Nacht bei 110 °C erhitzt. Die erkaltete Mischung wurde auf Eiswasser (400 ml) gegossen und mit Essigester (400 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde zunächst mit Wasser und anschließend mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung bis zur pH-Neutralität gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde Dioxan unter vermindertem Druck entfernt. Es verblieb eine gelb gefärbte Lösung, aus der durch Zugabe von Methanol ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde im Vakuum getrocknet und das Produkt **86** (4.04 g, 3.79 mmol, 66 %) isoliert.





<b>C<sub>68</sub>H<sub>92</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub></b>	1029.48 g mol <sup>-1</sup>
<b>Ausbeute</b>	728 mg (707 µMol, 83 %, gelblicher Feststoff)
<b>R<sub>f</sub>-Wert</b>	0.34 (SiO <sub>2</sub> , Essigester/Cyclohexan/Methanol = 2/7/1)
<b>Smp.</b>	189 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 0.81-0.93 (m, 12H, CH <sub>3</sub> ), 1.20-1.41 (m, 40H, CH <sub>2</sub> ), 1.80-1.98 (m, 8H, CH <sub>2</sub> ), 3.13 (d, <sup>3</sup> J = 13.3 Hz, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 3.50 (s, 8H, O-CH <sub>2</sub> ), 3.87 (t, <sup>3</sup> J = 7.32 Hz, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 4.40 (d, <sup>3</sup> J = 13.1 Hz, 4H, ArCH <sub>2</sub> Ar), 6.62 (s, 8H, Aryl-CH) ppm.
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ): δ = 14.6 (CH <sub>3</sub> ), 23.3, 23.4, 26.9, 30.2, 30.4, 30.8, 32.5 (CH <sub>2</sub> ), 77.2 (CH <sub>2</sub> ), 124.0 (Aryl-C <sub>q</sub> ), 128.3 (Aryl-CH), 136.0, 156.8 (Aryl-C <sub>q</sub> ) ppm.
<b>FT-IR</b>	(ATR): $\tilde{\nu}$ = 2955 (m), 2921(s), 2852 (s), 2248 (w), 1685 (w), 1600 (w), 1465 (s), 1380 (m), 1277 (m), 1221 (s), 1145 (s), 1013 (s), 982 (m), 859 (m), 805 (w), 722 (w) cm <sup>-1</sup> .
<b>LR-MS</b>	(pos. ESI-ToF): m/z = 1051.7019 [M - Na <sup>+</sup> ] <sup>+</sup> ; berechnet für: [C <sub>68</sub> H <sub>92</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Na] <sup>+</sup> : 1051.7011.

Darstellung des 5,11,17,23-Tetrakis(2-aminoethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]aren-Hydrochlorids (**88·HCl**)



Das Tetranitril **86** (100 mg, 97.1 µMol, 1.0 Äq.) wurde unter Argon in abs. Tetrahydrofuran (5 ml) gelöst und 1 M Boran-Tetrahydrofuran-Komplex-Lösung (1.95 ml, 19.7 mmol, 203 Äq.) innerhalb von 20 min zugetropft. Es wurde 6 h bei 70 °C erhitzt und nach kurzem Abkühlen noch weitere Boran-Tetrahydrofuran-Lösung (1.1 ml, 11.1 mmol, 115 Äq.)

hinzugetropft. Nach 24 h bei 70 °C wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand mit einer Mischung aus Wasser/Methanol/konz. Salzsäure (2/4/2, 40 ml) eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Der entstandene Feststoff wurde filtriert und mithilfe der MPLC (RP18, Gradient, Wasser/Methanol + 0.05 % TFA) gereinigt. Nach Lyophilisation unter Umsalzen mit Salzsäure wurde das Tetraammoniumchlorid **88·HCl** (114 mg, 95.7 µMol, 99 %) als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>68</sub>H<sub>112</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>** 1191.45 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 114 mg, 95.7 µMol, 99 %, farbloser Feststoff

**HPLC**  $r_t$  = 9.69 min, Gradient: 80-100 % Methanol + 0.05 % TFA in 15 min, 97 % Reinheit bei 220 nm

**Smp.** 64 - 67 °C

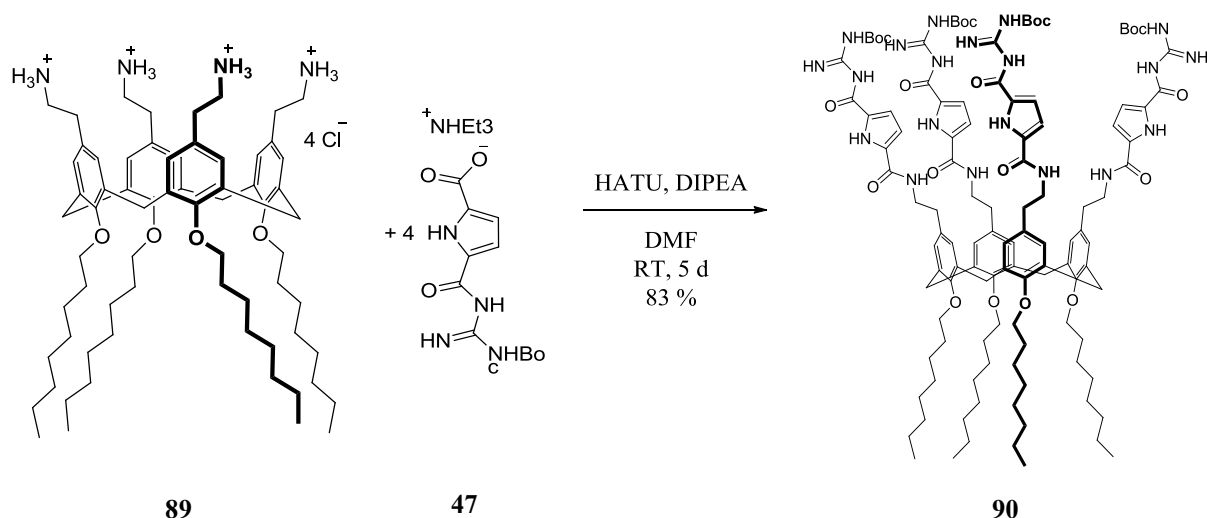
**<sup>1</sup>H-NMR** (**300 MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  = 0.80-0.90 (m, 12H, CH<sub>3</sub>), 1.16-1.46 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1.80-1.93 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.54-2.65 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.72-2.85 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 3.12 (d, <sup>3</sup> $J$  = 13.41 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.78 (m, 8H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 4.27 (d, <sup>3</sup> $J$  = 19.9 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.55 (s, 8H, Aryl-CH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (**75 MHz, CDCl<sub>3</sub>**):  $\delta$  = 13.8 (CH<sub>3</sub>), 22.1, 26.0, 29.1, 29.5, 29.9, 31.4, 32.5 (CH<sub>2</sub>), 74.8 (OCH<sub>2</sub>), 127.9 (Aryl-CH), 130.4, 134.45, 154.8 (Aryl-C<sub>q</sub>) ppm.

**FT-IR** (**ATR**):  $\tilde{\nu}$  = 3055 (w), 298 (s), 1594 (m), 1254 (m), 1231 (m), 1119 (s), 1102 (s), 1007 (m), 975 (s), 925 (m), 804 (s), 771 (s), 697 (s) cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS** (**pos. ESI-ToF**):  $m/z$  = 1067.8263 [M 0+ Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1045.8459 [M + H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 523.4274 [M + 2H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup>; 349.2878 [M + 3H<sup>+</sup>]<sup>3+</sup>;  
berechnet für: [C<sub>68</sub>H<sub>108</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na]<sup>+</sup>: 1067.8263; [C<sub>68</sub>H<sub>109</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 1045.8443; [C<sub>68</sub>H<sub>110</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>: 523.4258; [C<sub>68</sub>H<sub>111</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>3+</sup>: 349.2863.

Darstellung des 5,11,17,23-Tetrakis(*GCP*-2-amidoethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]arens (**90**)



*GCP* **47** (99.0 mg, 0.25 mmol, 4.80 Äq.) wurden in abs. Dimethylformamid (1 ml) gelöst und mit DIPEA (30 µl) versetzt. Es wurde HATU (95 mg, 0.25 mmol, 4.80 Äq.) zugegeben und eine Stunde lang bei 0 °C gerührt. Währenddessen wurde **89** (63.3 mg, 53.1 µMol, 1.0 Äq.) in abs. Dimethylformamid (16 ml) suspendiert und mit DIPEA (480 µl) versetzt. Dieser wurde zum gebildeten Aktivester hinzugegeben und 5 d bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und ein gelber fester Rückstand in Essigester aufgenommen und mit Wasser extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel destillativ im Vakuum entfernt. Dieses wurde säulenchromatographische (SiO<sub>2</sub>, Essigester/Cyclohexan/Isopropanol = 6/3/1) aufgereinigt und das Produkt **90** (109 mg, 44.3 µMol, 83 %) als gelblicher Feststoff isoliert.

**C<sub>116</sub>H<sub>164</sub>N<sub>20</sub>O<sub>20</sub>** 2158.67 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 109 mg (44.3 µMol, 83 % gelblicher Feststoff)

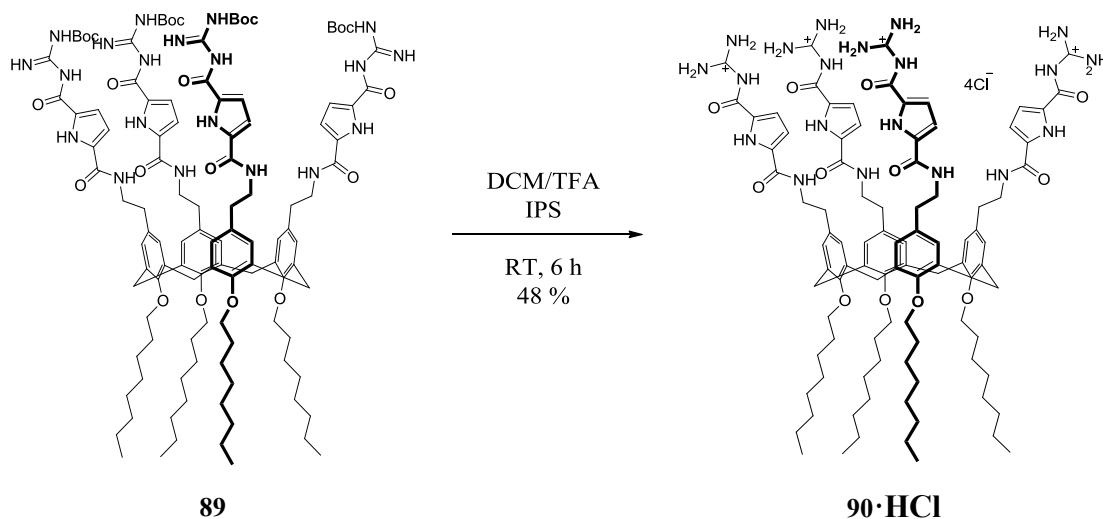
**R<sub>f</sub>-Wert** 0.34 (SiO<sub>2</sub>, Essigester/Cyclohexan = 1/1)

**HPLC** SiO<sub>2</sub>, *r*<sub>t</sub> = 4.32 min (Isokratisch: Essigester/Cyclohexan/Isopropanol = 6/3/1, 77 % Reinheit bei 290 nm)

**Smp.** 75 °C

- $^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.81-0.90 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 1.23-1.38 (m, 40H,  $\text{CH}_2$ ), 1.78-1.94 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1.94 (m, 8H,  $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NR}$ ), 3.04 (m, 4H,  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ), 3.12 (m, 8H,  $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NR}$ ), 3.76 (m, 8H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.25 (m, 4H,  $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ), 6.49 (s, 8H, Aryl-CH), 6.72 (d,  $^3J$  = 3.96, 4H, Pyrrol-CH), 6.79 (m, 4H, Pyrrol-CH), 8.32, 8.56 (br. s, 4H, Guanidino-NH), 9.30, 10.85 (br. s, 4H, Amid-NH), 11.3 (s, 4H, Pyrrol-NH) ppm.
- $^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 13.9 ( $\text{CH}_3$ ), 22.2, 26.0 ( $\text{CH}_2$ ), 27.8 ( $\text{CH}_3$ ), 29.2, 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 30.0 ( $\text{ArCH}_2\text{Ar}$ ), 31.6 ( $\text{CH}_2$ ), 34.7, 40.8 ( $\text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{NR}$ ), 62.1 (*Boc*- $\text{C}_q$ ), 74.8 ( $\text{OCH}_2$ ), 112, 114 (Pyrrol-CH), 128 (Aryl-CH), 132, 134, 154, 158, 160 ( $\text{C}_q$ ) ppm.
- FT-IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3379 (sb), 3258 (sb), 2924 (w), 2853 (w), 1722 (m), 1626 (s), 1550 (s), 1465 (s), 1291 (s), 1237 (s), 1144 (s), 1022 (s), 755 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .
- LR-MS** (pos. ESI-ToF):  $m/z$  = 1101.68 [ $\text{M} + 2\text{Na}^+$ ] $^{2+}$ ; berechnet für:  $[\text{C}_{116}\text{H}_{164}\text{N}_{20}\text{O}_{20}\text{Na}_2]^{2+}$ : 1101.61.

Darstellung des 5,11,17,23-Tetrakis(GCP-2-amidoethyl)-25,26,27,28-Tetraoctylether-Calix[4]aren-Hydrochlorid (**90**·HCl)



**90** (50 mg, 23.2  $\mu\text{Mol}$ , 1.0 Äq.) wurden in Dichlormethan (10 ml) gelöst und mit TFA (10 ml) und Isopropylsilan (0.5 ml) versetzt. Diese Reaktionsmischung wurde bei RT für 6 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Wasser versetzt und lyophilisiert. Das Produkt wurde an der MPLC (Gradient: 10-100 % Methanol + 0.05 % TFA in 45 min) gereinigt und **90** (8 mg, 4.20  $\mu\text{Mol}$ , 18 %) nach Gefriertrocknung mit HCl als farbloser Feststoff isoliert.

**C<sub>96</sub>H<sub>136</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>** 1904.05 g mol<sup>-1</sup>

**Ausbeute** 8 mg, 4.20 μMol, 18 %

**HPLC**  $r_t$  = 7.35 min, Gradient: 10-100 % Methanol + 0.05 % TFA in 15 min, 96 % Reinheit bei 220 nm

**Smp.** 212 °C (Zersetzung)

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.82–0.91 (m, 12H, CH<sub>3</sub>), 1.22–1.43 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1.81–1.91 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (m, 8H, ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR), 3.07 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 12.7 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 3.78 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>), 4.27 (d, <sup>3</sup>J(H,H) = 12.65 Hz, 4H, ArCH<sub>2</sub>Ar), 6.51 (s, 8H, Aryl-CH), 6.81 (m, 4H, Pyrrol-CH), 7.43 (m, 4H, Pyrrol-CH), 8.32–8.69 (m, 16H, Guadinium-NH, 4H, Amid-NH), 11.85 (s, 4H, Gua-NH), 12.21 (s, 4H, Pyrrol-NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 13.9 (CH<sub>3</sub>), 22.2, 26.0, 29.1, 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-R), 30.2 (ArCH<sub>2</sub>Ar), 31.5 (CH<sub>2</sub>), 34.7 (ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR), 40.8 (ArCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR), 74.7 (OCH<sub>2</sub>), 112.2, 115.9 (Pyrrol-CH), 125.2 (Pyrrol-C<sub>q</sub>), 128.0 (Aryl-CH), 132.2 (Aryl-C<sub>q</sub>), 132.9 (Pyrrol-C<sub>q</sub>), 134.2 (Aryl-C<sub>q</sub>-CH<sub>2</sub>R), 154.5 (C<sub>q</sub>, ArC<sub>q</sub>OOct), 155.4, 158.9, 159.6 (C<sub>q</sub>) ppm.

**FT-IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 3313 (w), 3120 (w), 2916 (m), 2854 (m), 1689 (s), 1628 (s), 1554 (s), 1462 (s), 1281 (s), 1200 (s), 1142 (m), 1011 (s), 810 (m), 721 (s) cm<sup>-1</sup>.

**HR-MS** (pos. ESI-ToF):  $m/z$  = 1780.0255 [M + Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 1758.0429 [M + H<sup>+</sup>]<sup>+</sup>; 901.5084 [M + 2Na<sup>+</sup>]<sup>2+</sup>; 879.5253 [M + 2H<sup>+</sup>]<sup>2+</sup>; 586.6861 [M + 3H<sup>+</sup>]<sup>3+</sup>; berechnet für: C<sub>96</sub>H<sub>132</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>Na<sup>+</sup>: 1780.0226; C<sub>96</sub>H<sub>133</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup>: 1758.0406; C<sub>96</sub>H<sub>132</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub>Na<sub>2</sub><sup>2+</sup>: 901.5059; C<sub>96</sub>H<sub>134</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub><sup>2+</sup>: 879.5240; C<sub>96</sub>H<sub>135</sub>N<sub>20</sub>O<sub>12</sub><sup>3+</sup>: 586.6851.

## 7.4 METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON BINDUNGSKONSTANTEN

### Vorbereitung der ctDNA

ctDNA (5 mg) von *Sigma-Aldrich* wurde ohne weitere Bearbeitung mit einer Plastikpinzette in ein Zentrifugenröhrchen (*Falcon<sup>TM</sup>*-typ) überführt und mit Natriumcacodylatpuffer (pH 7, 0.05 M, 1.5 ml) versetzt. Diese Suspension wurde 20 h bei 4 °C gelagert und anschließend mit Ultraschall (8 mal je 4 s) behandelt. Die Lösung wurde über einen PTFE-Filter filtriert und mit 0.5 ml Puffer einmal gespült. Die Konzentration der Lösung wurde über die Phosphatkonzentration mit Hilfe des Epsilon-Wertes (6600 l/molcm) beim Absorptionsmaximum von 260 nm bestimmt. Dazu wurde fünfmal 1 µl der ctDNA-Lösung in Cacodylatpuffer (pH 7, 0.05 M) titriert und über die erhaltene UV/Vis-Absorption die Konzentration bestimmt.

### Ethidiumbromid-Verdrängungsassay

Zunächst wurden Stammlösungen aus Ethidiumbromid (0.1 mM) und ctDNA (0.75 mM) in wässrigem Cacodylatpuffer (0.01 M, pH 5) hergestellt. Der zu titrierende Rezeptor wurde mit einer 1 mM Stammlösung aus DMSO mit demselben Cacodylatpuffer auf 5 µM verdünnt.

Für die Titration wurden 889.65 µl in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt und 6.75 µl der Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben und durchmischt. Die erhaltene 0.75 µM (1 Äq.) Lösung wurde vermessen und so das Spektrum des reinen Ethidiumbromids erhalten, welches später abgezogen werden konnte. Dazu wurden 3.6 µl (4 Äq.) der ctDNA-Stammlösung gegeben und nach 5 min das Spektrum des Ethidiumbromid/DNA-Komplexes aufgenommen. Im Folgenden wurde der Rezeptor in verschiedenen Aliquots zugegeben und nach durchmischen und 1 min Inkubationszeit gemessen.

Messparameter:  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 560\text{-}650 \text{ nm}$ ; Em slit width 20 nm; Ex slit width 20 nm

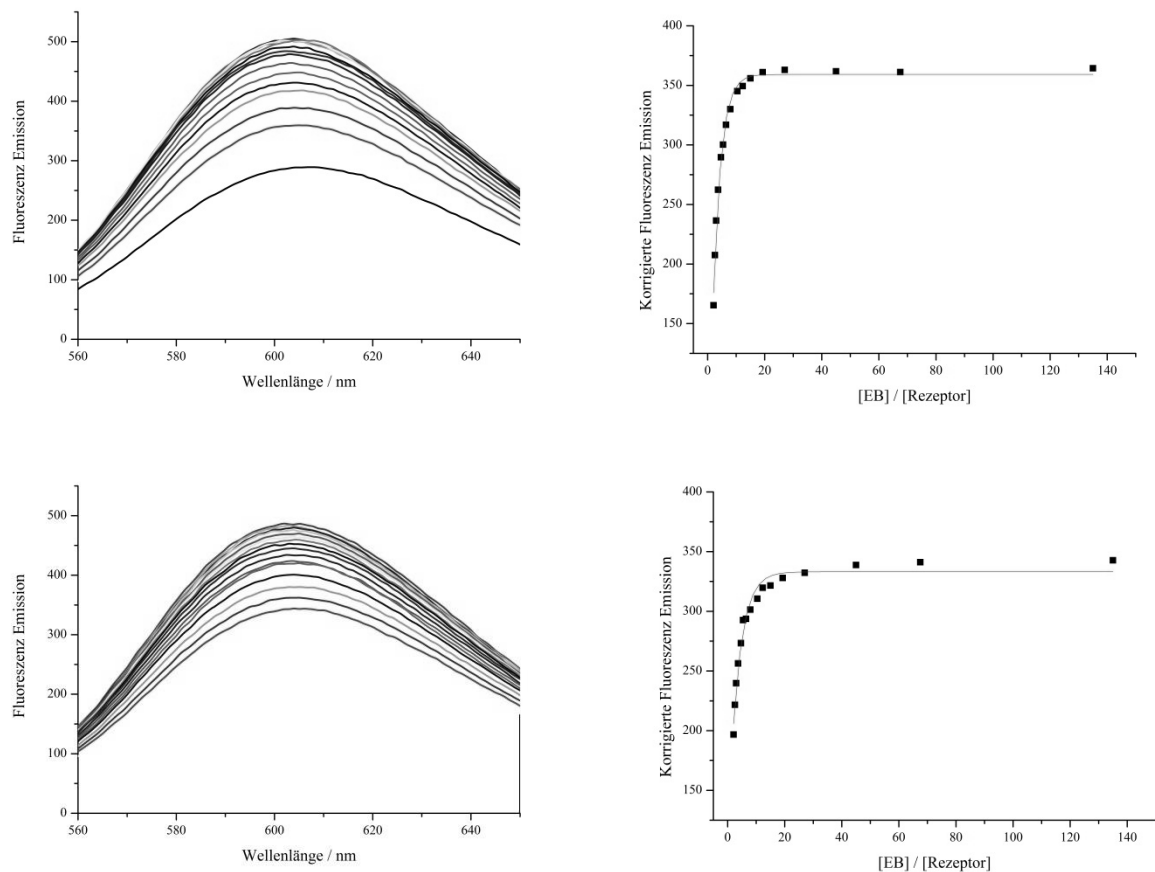


Abb. 7-1 oben: 65 , unten 90 Messparameter:  $\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 560-650 \text{ nm}$ ; Em slit width 20 nm; Ex slit width 20 nm. Ethidiumbromid-Verdrängungsassay mit ctDNA und UTM24 (links) und Fit der korrigierten Fluoreszenz Emission bei 600 nm gegen die Verteilung von EB/UTM24 (rechts).

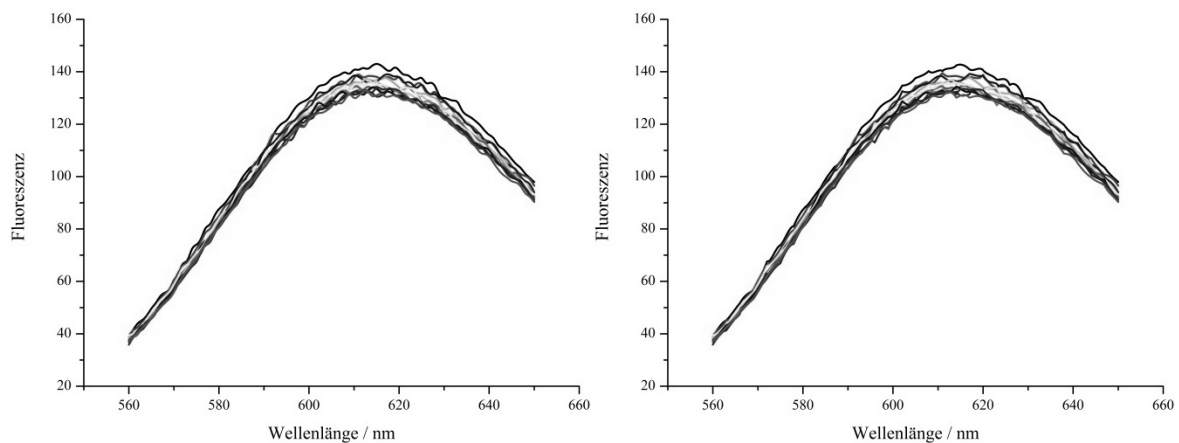


Abb. 7-2 Kontrollexperiment: Titration ohne DNA zur Kontrolle möglicher Wechselwirkungen zwischen Ethidiumbromid und Rezeptoren 65 (links) und 90 (rechts).



ITC mit ctDNA und Rezeptor 65

Eine 10 mM Stammlösung von **65** in DMSO wurde eingesetzt und eine ctDNA-Stammlösung mit einer Konzentration von  $2.34 \cdot 10^{-2}$  M in Cacodylatpuffer (0.01 M, pH 7.0). Es wurden auch die Hintergrundmessungen sowohl der Titration von Rezeptor **65** zu ctDNA durchgeführt als auch die Verdünnung der ctDNA-Lösung durchgeführt. Die Verdünnung des Rezeptors wurde bei der Berechnung berücksichtigt, wohingegen eine Verdünnung der ctDNA in der Zelle keine Verdünnungseffekte zeigt. Die Titration wurde mit Cacodylatpuffer (0.01 M, pH 5, 6 % DMSO) mit einer Konzentration von 0.6 mM in der Spritze und ctDNA mit 0.1 mM im selben Lösemittel durchgeführt.

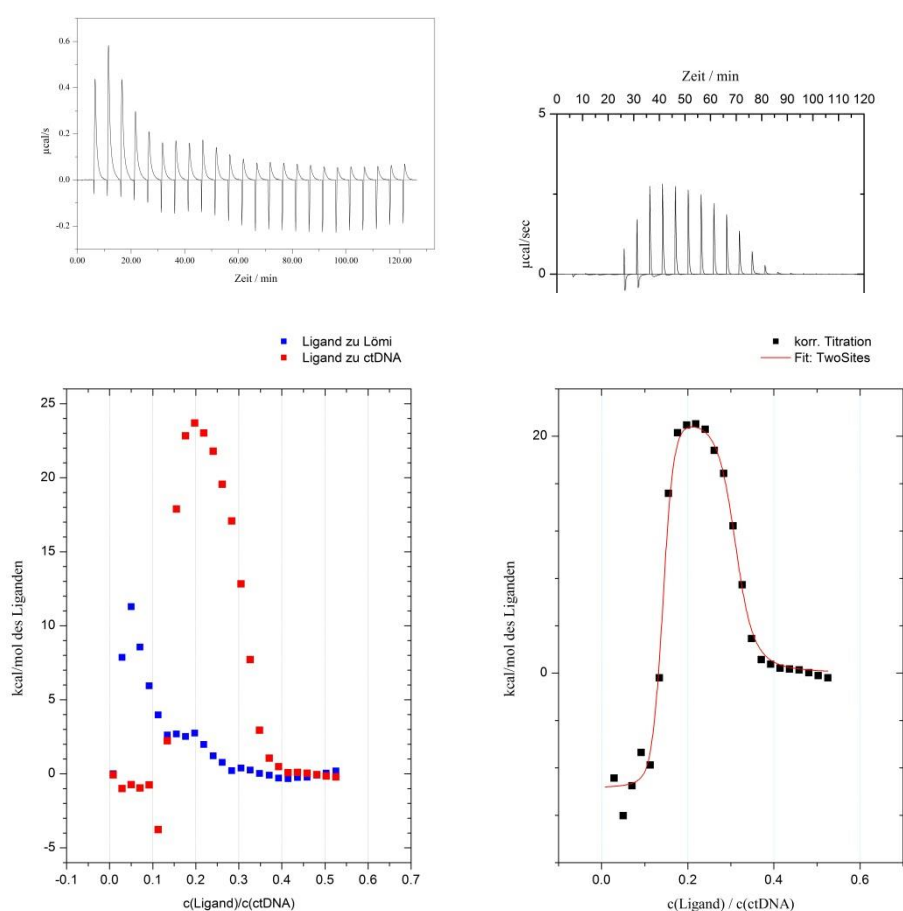
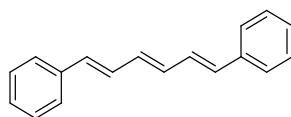


Abb. 7-3 links: ITC mit ctDNA und **65**(rot, oben rechts), Hintergrundmessung **31** zu Lösemittel (blau, oben links). Rechts: Titration abzüglich der Hintergrundmessung und Fit mit einem „TwoSites“-Modell.

$N_1$	$0.131 \pm 0.0013$
$K_1$	$1.74 \cdot 10^9 \pm 7.8 \cdot 10^8$
$\Delta H_1$	$-9725 \pm 481$
$\Delta S_1$	9.66
$N_2$	$0.170 \pm 0.0032$
$K_2$	$4.87 \cdot 10^6 \pm 1.3 \cdot 10^6$
$\Delta H_2$	$2.203 \cdot 10^4 \pm 638$
$\Delta S_2$	104

Tab. 7-1 Der Fit mit Origin ergab für ein „TwoSites“-Bindungsmodell folgende Werte.

DPH-Messung<sup>112</sup>**66**

Es wurden parallel drei 1 mM Stammlösungen aus DPH **66** und des jeweiligen Calixarenes **65** bzw. **90** in DMSO hergestellt. Die Fluoreszenzküvetten wurden mit je 0.8  $\mu\text{l}$  DHP-Stammlösung **66** versetzt und dazu ein variierender Anteil des jeweiligen Calixarenes zugegeben. Durch Anpassung einer weiteren Zugabe von DMSO und Zugabe von TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6) wurde ein Gesamtvolumen von 800.8  $\mu\text{l}$  und einem DMSO-Anteil von 1.1 % pro Küvette erreicht (siehe Tab. 7-2). Diese Proben wurden 12 h mit Hilfe eines Peptidschüttlers geschwenkt und danach eine Fluoreszenzmessung des Emissionsspektrums durchgeführt.

c(Amphiphil) / c(DHP)	Küvette	Puffer / $\mu\text{l}$	DHP-Stammlsg. / $\mu\text{l}$	<b>65</b> bzw. <b>90</b> / $\mu\text{l}$	DMSO. / $\mu\text{l}$
0	1	791.2	0.80	0	8.0
1.00	2	791.2	0.80	0.80	7.2
1.50	3	791.2	0.80	1.20	6.8
2.00	4	791.2	0.80	1.60	6.4
2.50	5	791.2	0.80	2.00	6.0
5.00	6	791.2	0.80	4.00	4.0
7.50	7	791.2	0.80	6.00	2.0
10.0	8	791.2	0.80	8.00	0

Tab. 7-2 Pipettierschema für eine DPH-Messung.

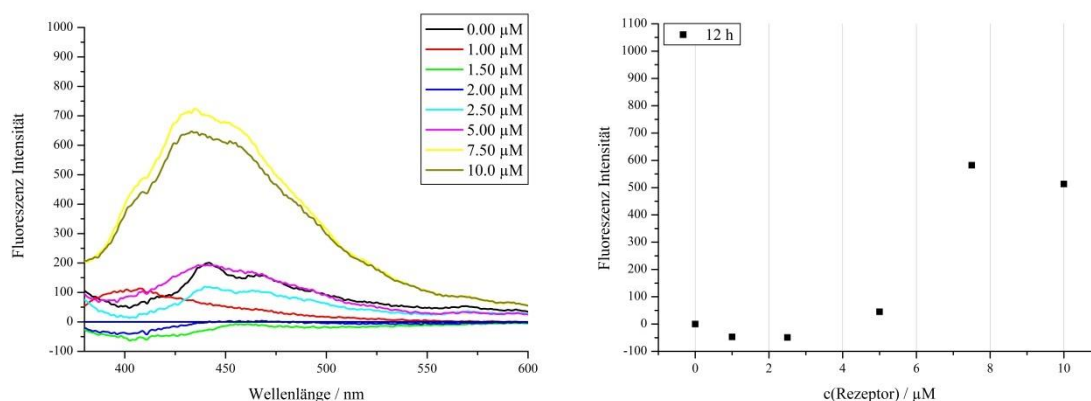


Abb. 7-4 links: Fluoreszenzspektren bei zunehmendem Anteil des Amphiphiles **90**. rechts: Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration der Verbindung **65** bei 429 nm.

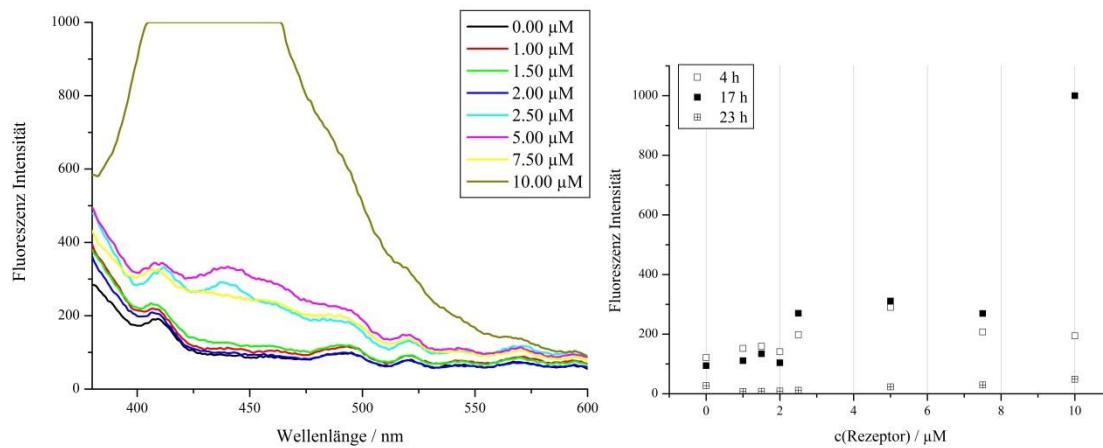


Abb. 7-5 links: Fluoreszenzspektren bei zunehmendem Anteil des Amphiphiles **90**. rechts: Auftragung der Fluoreszenzintensitäten gegen die Konzentration des Amphiphiles **90** bei 470 nm.

#### Protein Expression P97 (Durchgeführt von Dr. Kamp-Meltzer)

Das Plasmid pQE9.His.p97Wt wurde in *E. coli* BLR.pREP4 transformiert. Die Bakterien wurden zur Expression von P97 in 12 l Kultur (Luria-Bertani Medium mit *selecting antibiotic* 100 mg/L Ampicillin) gezüchtet. Bei  $OD_{600} = 0.6 - 0.8$ , wurde die Expression mit 0.2 mM IPTG induziert. Man exprimiert P97 16 h bei 18°C. Die Kultur wurde 15 min bei 1500 G bei 4 °C zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und wieder zentrifugiert und schließlich die Pellets schockgefrostet.

Reinigung von P97: Zunächst wurden die Pellets in Lysispuffer suspendiert (80 ml) und zweimal durch eine French Press gegeben. Es wurde 20 min bei 15 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Inzwischen wurden 2 Säulen mit 3 ml Ni-NTA beads (*Qiagen*) gefüllt. Die Lagerlösung wurde abgelassen und die Säulen mit Lysispuffer äquilibriert (2x 6 ml). Die Beads wurden zum Überstand gegeben und unter leichter Rotation 1 h bei 4 °C inkubiert. Es wurde 2 min bei 1000 G zentrifugiert, die Beads mit Waschpuffer (2 x 6 ml) gewaschen und die Beads zurück in die zweite Säulen gepackt. Das Protein wurde mit 8 x 1.5 ml mit Puffer eluiert. Es wurde eine Bradford Reaktion zur Markierung der Protein enthaltenden Fraktionen durchgeführt. Weitere Reinigung mittels FPLC.

Lysispuffer: 500 mM KCl, 100 mM Tris pH = 7.4, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 % Glycerol, 20 mM Imidazole, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM ATP

Waschpuffer: 150 mM KCl, 50 mM Hepes pH= 7.4, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 % glycerol, 20 mM Imidazole, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM ATP

### ITC-Messung mit P97 und 65

Das ITC-Experiment wurde unter Zugabe des Rezeptors **65** (18.98  $\mu\text{M}$ ) zu P97 (3.20  $\mu\text{M}$ ) in HEPES-Puffer (0.02 M, inklusive: 0.13 M KCl, 0.001 M  $\text{MgCl}_2$ , 8 % Glycerin, 20 % DMSO) bei pH 7.4 und 25 °C durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die Verdünnung des Rezeptors **65** gemessen und bei der Berechnung berücksichtigt. Diese ITC-Messung lieferte eine nur sehr geringe und nahezu linear abnehmende Wärmetönung. Damit ist eine Auswertung zur Bestimmung einer Bindungskonstante kaum korrekt zu realisieren (siehe Tab. 7-3).

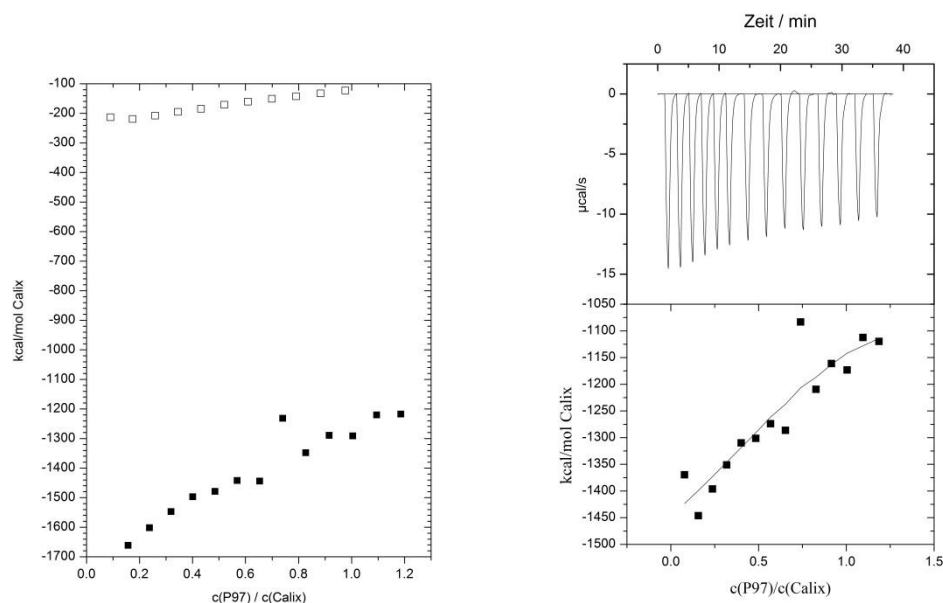


Abb. 7-6 Links: ITC-Experiment unter Zugabe des Rezeptors **65** zu P97 mit zugehöriger Verdünnung. Bedingungen: Lösemittelgemisch: 0.13 M KCl, 0.02 M Hepes pH 7.4, 0.001 M  $\text{MgCl}_2$ , 8 % Glycerin, 20 % DMSO,  $c(\text{P97}) = 3.20 \mu\text{M}$ ,  $c(\mathbf{65}) = 18.98 \mu\text{M}$ . Rechts: Berechnete Kurve unter Abzug der Verdünnung nach einem sequentiellen Bindungsmodell.

	P97
$K_1 / \text{M}^{-1}$	$5.17 \cdot 10^4 \pm 1.6 \cdot 10^4$
$\Delta H_1 / \text{kJ/mol}$	$-1.0545 \cdot 10^7 \pm 2.73 \cdot 10^6$
$\Delta S_1 / \text{kJ}/(\text{mol} \cdot \text{K})$	$-3.53 \cdot 10^4$
$K_2 / \text{M}^{-1}$	$7.00 \cdot 10^4 \pm 2.5 \cdot 10^4$
$\Delta H_2 / \text{kJ/mol}$	$3.238 \cdot 10^6 \pm 4.26 \cdot 10^6$
$\Delta S_2 / \text{kJ}/(\text{mol} \cdot \text{K})$	$1.09 \cdot 10^4$
$K_3 / \text{M}^{-1}$	$1.74 \cdot 10^5 \pm 7.6 \cdot 10^4$
$\Delta H_3 / \text{kJ/mol}$	$-5.289 \cdot 10^6 \pm 8.89 \cdot 10^6$
$\Delta S_3 / \text{kJ}/(\text{mol} \cdot \text{K})$	$-1.77 \cdot 10^4$

Tab. 7-3 Auswertung des ITC-Experiments der Zugabe von **65** zu P97 unter Zuhilfenahme eines sequentiellen Bindungsmodells.

ATPase-Assay (Durchgeführt von Dr. Kamp-Meltzer)

## Vorbereitung

Die Materialien wurden gereinigt, um eine Phosphatkontamination zu vermeiden.

## Standard-Messung zur Bestimmung einer Kalibriergeraden

Es werden 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16  $\mu\text{l}$  des Standards (1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) mit Puffer auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Gemessen wird die UV-Absorption bei 650 nm. Es wurden 800  $\mu\text{l}$  des gefärbten Reagenzes (10 ml [0.034 % Malachitgrün, 1.04 %  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 1M HCl] + 40  $\mu\text{l}$  10 % Tween 20) zugegeben und gemischt. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 100  $\mu\text{l}$  34 %ige Lösung an Natriumcitrat hinzugegeben und vermischt. Nach 10 min wurde diese Mischung in Plastikküvetten überführt und die Absorption bei 650 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient beträgt 80 l/(molcm).

<b>nmol <math>\text{P}_i</math></b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>16</b>
<b><math>\mu\text{l}</math> Standard</b>	0	2	4	6	8	10	12	16
<b><math>\mu\text{l}</math> Reaktionspuffer</b>	100	98	96	94	92	90	88	84

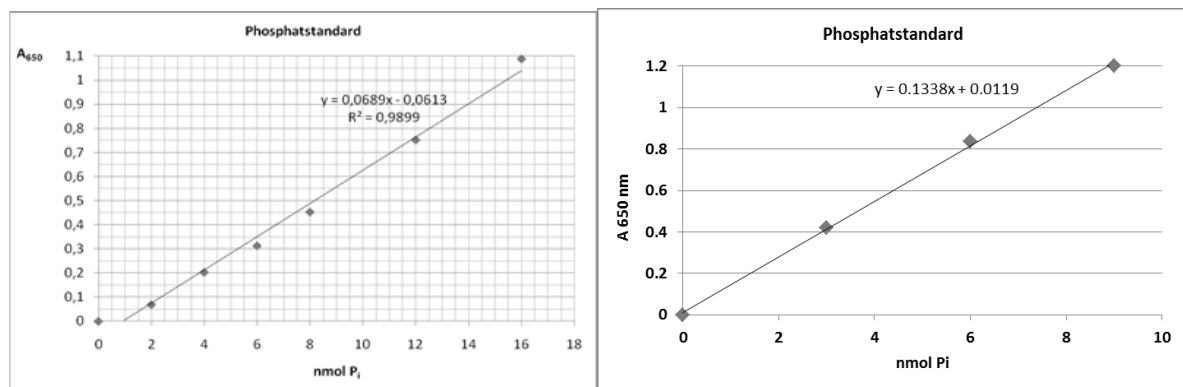


Abb. 7-7 links: Bestimmung der Kalibriergeraden für die Messung von 65. rechts: Bestimmung der Kalibriergeraden für die Messung von 90.

Es wurden 800  $\mu\text{l}$  des gefärbten Reagenzes (10 ml [0.034 % Malachitgrün, 1.04 %  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 1M HCl] + 40  $\mu\text{l}$  10 % Tween 20) zugegeben und gemischt. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 100  $\mu\text{l}$  34 %ige Lösung an Natriumcitrat hinzugegeben und vermischt. Nach 10 min wurde diese Mischung in Plastikküvetten überführt und die Absorption bei 650 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient beträgt 80 l/(molcm).

## Assay

1  $\mu\text{g}$  P97 und 1  $\mu\text{g}$  P47 wurden in 40  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer gegeben und bei 0 °C vermischt. Es wurde 15 min bei 0 °C gekühlt und dann 30 min bei 37 °C erwärmt. Es wurden 800  $\mu\text{l}$  des

gefärbten Reagenzes (10 ml [0.034 % Malachitgrün, 1.04 %  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 1M HCl] + 40  $\mu\text{l}$  10 % Tween 20) zugegeben und gemischt. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 100  $\mu\text{l}$  34 %ige Lösung an Natriumcitrat hinzugegeben und vermischt. Nach 10 min wurde diese Mischung in Plastikkuvetten überführt und die Absorption bei 650 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient beträgt 80 l/(mol·cm).

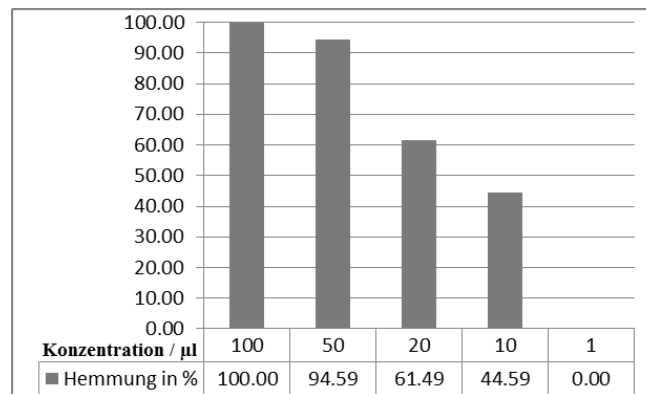


Abb. 7-8 Hemmung der ATPase-Aktivität in Prozent von P97 mit abnehmender Konzentration an **90**.

#### Gentransfektion (Durchgeführt von Franziska V. Dietrich, AG Knauer)<sup>129</sup>

Für die Transfektion wurden A431-Zellen am Vortag auf 96-Loch Platten ausgesät. Von den potentiellen Transfektionssubstanzen wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 5 mM in wässriger DMSO-Lösung (50 %) hergestellt. Für die Transfektion wurden Konzentrationen von 5, 15 und 25  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Als Kontrollsubstanz diente Lipofectamin2000 (Invitrogen, 1 mg/ml, Karlsruhe). Um mögliche Transfektionseigenschaften in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration zu überprüfen, wurden Zellen unter Verwendung von p500-markierter Plasmid-DNA transfiziert. Zunächst wurden die DNA-Transporter-Substanzen und die DNA getrennt in NaCl bzw. Opti-MEM(R) gelöst und anschließend zusammengegeben (Tab. 7-4). Diese Substanz-DNA-Mischung wurde ohne Nährmediumswechsel direkt auf die Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C und 5.0 %  $\text{CO}_2$  wurde das Medium entfernt und 100  $\mu\text{l}$  DMEM<sup>+++</sup> (Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Antibiotic-Antimycotic (10000 U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin sulfate, 25  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B)) zugegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37 °C und 5.0 %  $\text{CO}_2$  wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Zeiss Axiovert 200M; Software: MetaMorph, Version 6.3r6).

Substanz	V (Substanz) / $\mu\text{l}$	V(NaCl) / $\mu\text{l}$	Endkonz. / $\mu\text{M}$	DNA / $\mu\text{l}$	V(NaCl) / $\mu\text{l}$
jetPEI	0.2	10	7.5	0.25	10

Substanz	V (Substanz) / $\mu\text{l}$ ( %DMSO)	V(Opti-MEM(R)) / $\mu\text{l}$	Endkonz. / $\mu\text{M}$	DNA / $\mu\text{l}$	V(Opti-MEM(R)) / $\mu\text{l}$
Lipofectamin	0.35				
65					
90	0.5 (0.1)		5		
65		25		0.5	25
90	1.5 (0.3)		15		
65					
90	2.5 (0.5)		25		

Tab. 7-4 Pipettierschema für die Gentransfektion mit DNA:pCDNA3-GFP.<sup>129</sup>

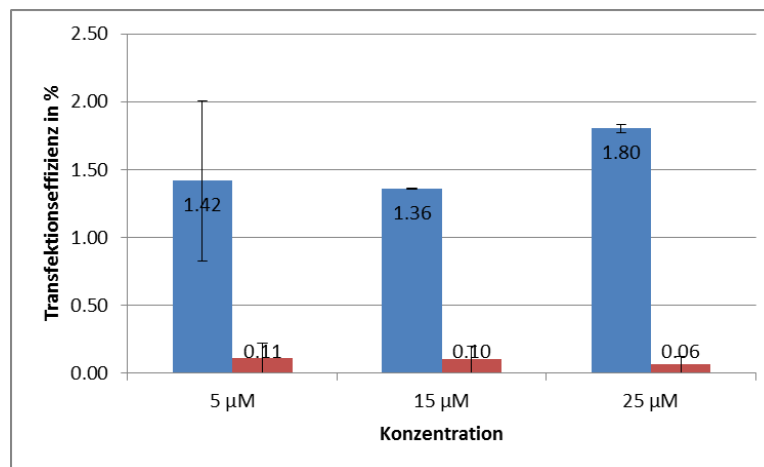


Abb. 7-9 Darstellung der mittleren Transfektionseffizienz aus drei Auszählungen unter Angabe der Standardabweichung von rot: 65 und blau: 90.

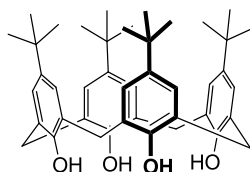




## 8 ANHANG

### 8.1 DEFINITIONEN

#### Nomenklatur der Calixarene



Nach IUPAC wird die von Gutsche eingeführte Bezeichnung des „Calixarens“ für Derivate der Cyclo{oligo[(1,3-phenyl)methylen]} verwendet.<sup>130</sup>

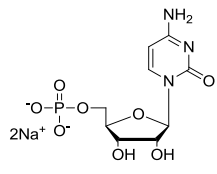
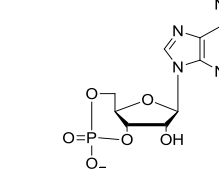
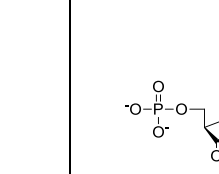
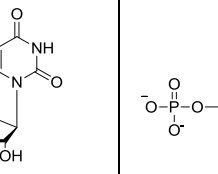
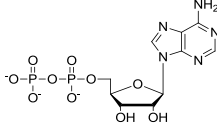
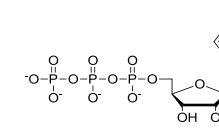
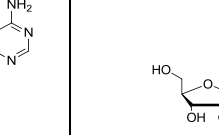
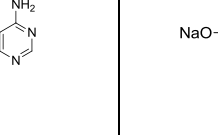
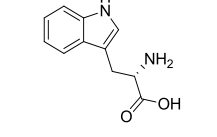
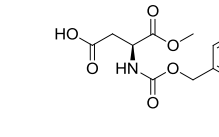
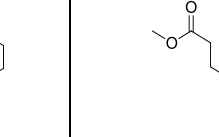
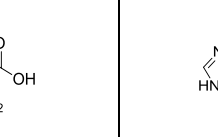
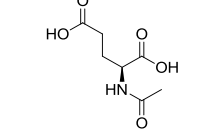
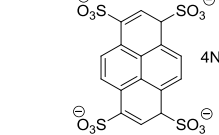
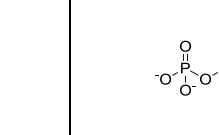
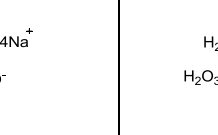
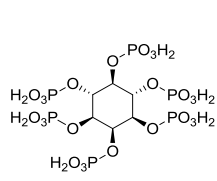
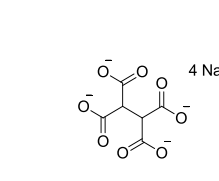
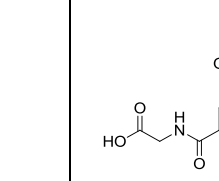
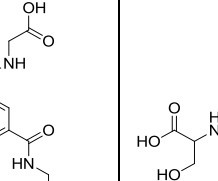
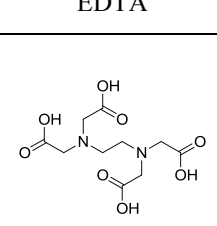
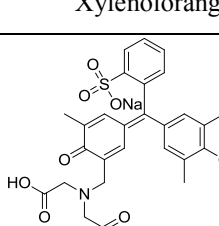
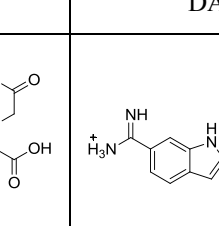
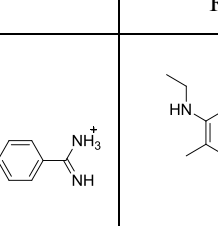
Beispielsweise lautet der systematische Name nach Gutsche 5,11,17,23-Tetra-*tert*-butyl-25,26,27,28-tetrahydroxycalix[4]aren.<sup>29</sup> Es ist ebenso üblich bei unsubstituierten Hydroxylgruppen deren Bezeichnung und die Bezifferung der *para*-Substituenten nicht zu erwähnen, für das oben genannte Beispiel also *p-tert*-Butylalix[4]aren.

Die *para*-Positionen zu den phenolischen Hydroxylfunktionen werden als *upper rim* bezeichnet, die der Hydroxylfunktion selbst als *lower rim*.

#### Verwendete Kurzbezeichnungen der Verbindungen der Übersichtsmessung (S. 83)

CMP	Cytidinmonophosphat	<i>L</i> -Trp	<i>L</i> -Tryptophan
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	<i>Z-L</i> -Asp-OMe	<i>Z-L</i> -Asparaginsäure-4-methylester
UMP	Uridinmonophosphat	<i>L</i> -Glu(Me)-OH	Monomethyl- <i>L</i> -glutamat
GMP	Guanosinmonophosphat	<i>L</i> -His	<i>L</i> -Histidin
AMP	Adenosinmonophosphat	Ac-Glu	<i>N</i> -Acetylglutaminsäure
ADP	Adenosindiphosphat	PTSA	1,3,6,8-Pyrentetrasulfonsäure tetranatriumsalz
ATP	Adenosintriphosphat		
G-6-P-Na	D(+)-Glucopyranose 6-phosphate Natriumsalz	PP <sub>i</sub>	Diphosphat-Anion

ATMP	Aminotris(methylene phosphonsäure)	essigsäure
IP6	Phytinsäure	BG126
Et(COO <sup>-</sup> ) <sub>4</sub>	Tetranatrium 1,1,2,2-Ethanetetracarboxylate	2-{3,5-Bis[(1-carboxy-2-hydroxyethylamino)carbonyl]benzoylamino}-3-hydroxypropionsäure
BG105	[3,5-Di(carboxymethylamino)-carbonylbenzoylamino]-	EDTA
		Ethylendiamintetraessigsäure
		DAPI
		4',6-Diamidin-2-phenylindol

<b>CMP</b>	<b>cAMP</b>	<b>UMP</b>	<b>GMP</b>
			
<b>ADP</b>	<b>ATP</b>	<b>Adenosin</b>	<b>G-6-P-Na</b>
			
<b>L-Trp</b>	<b>Z-L-Asp-OMe</b>	<b>L-Glu(Me)-OH</b>	<b>L-His</b>
			
<b>Ac-Glu</b>	<b>PTSA</b>	<b>PP<sub>i</sub></b>	<b>ATMP</b>
			
<b>iP6</b>	<b>Et(COO<sup>-</sup>)<sub>4</sub></b>	<b>BG105</b>	<b>BG126</b>
			
<b>EDTA</b>	<b>Xylenolorange</b>	<b>DAPI</b>	<b>Rhodamin</b>
			

## 8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin	h	Stunden
Å	Ångström (1 Å = 0.1 nm)	HATU	(1-[Bis(dimethylamino)-methylene-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium3-oxid hexafluorophosphate)
Abb.	Abbildung		
Abs	Absorption		
abs.	absolutiert		
Ac	Acetyl	HCTU	2-(6-Chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate
ADP	Adenosindiphosphat		
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
AMP	Adenosinmonophosphat		
Äqu.	Äquivalente	HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruck-flüssigkeitschromatographie
Arg	Arginin		
Asp	Asparaginsäure		
ATP	Adenosintriphosphat	Hz	Hertz
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	IR	Infrarot
		ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i> , Isothermale Titrationskalorimetrie
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	J	Joule oder Kopplungskonstante
°C	Grad Celsius		
cAMP	cyclisches AMP		
Cbz	Benzyloxycarbonyl	K <sub>Ass</sub>	Assoziationskonstante in M <sup>-1</sup>
CMP	Cytidinmonophosphat	kcal	Kilokalorien (1 kcal = 4.19 kJ)
ctDNA	<i>calf-thymus DNA</i> ; DNA gewonnen aus Klabsthymus	kHz	Kilohertz (1 kHz = 1 · 10 <sup>3</sup> Hz)
Cacodylat	Natriumcacodylathydrat (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>2</sub> Na · xH <sub>2</sub> O	kJ	Kilojoule (1 kJ = 1 · 10 <sup>3</sup> J)
CPK	Kalottenmodell von <i>Pauling</i> , <i>Corey</i> und <i>Koltun</i>	KMK	Kritische Mizellenkonzentration
		konz.	konzentriert
d	Schichtdicke der Küvette in cm	Lsg.	Lösung
DC	Dünnschichtchromatographie	M	molar, molare Masse
DIPEA	Hünig Base, <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	mg	Milligramm (1 mg = 1 · 10 <sup>-3</sup> g)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium (standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur)	µg	Mikrogramm (1 µg = 1 · 10 <sup>-6</sup> g)
DMF	Dimethylformamid	ml	Milliliter (1 ml = 1 · 10 <sup>-3</sup> l)
DMSO	Dimethylsulfoxid	µl	Mikroliter (1 µl = 1 · 10 <sup>-6</sup> l)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure	µm	Mikrometer (1 µm = 1 · 10 <sup>-6</sup> m)
DOPE	Dioleylphosphatidylethanolamin	mM	millimolar (1 mM = 1 & 10 <sup>-3</sup> M)
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien	mm	Millimeter (1 mm = 1 & 10 <sup>-3</sup> m)
ε	Extinktionskoeffizient, molarer Absorptionskoeffizient	mmol	Millimol (1 mmol = 1 & 10 <sup>-3</sup> mol)
EDC · HCl	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid	MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i> , Mitteldruck-flüssigkeitschromatographie
ESI	<i>electron spray ionisation</i> , hochauflösendes MS-Verfahren		
et al.	et alii, und andere	nm	Nanometer (1 nm = 1 · 10 <sup>-9</sup> m)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	MST	<i>MicroScale Thermophoresis</i>
		NMM	N-Methylmorpholin
g	Gramm	NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> , Kernresonanzspektroskopie
Glu	Glutaminsäure	OD	<i>optical density</i> , Absorption
Gua	Guanidinium-Gruppe	Opti-MEM®	standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
		P97	ATPase der Familie AAA <sup>+</sup>
		P47	Cofaktor von P97
		pa.	pro analysi (Reinheitsstufe von Chemikalien)
		PDB	Protein Datenbank

PDI	Polydispersionsindex ( $0 < \text{PDI} < 1$ )	RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonucleinsäure
pos.	positiv	RP	<i>reversed phase</i>
ppm	<i>parts per million</i> , Teile pro Million	RT	Raumtemperatur
PTFE-Filter	Polytetrafluorethylen (hydrophober Membranfilter)	Smp.	Schmelzpunk
PyBOP	(Benzotriazol-1-yloxy)- tripyrrolidino- Phosphoniumhexafluorophosphat	SPM	<i>scanning probe microscopy</i> , Rastersondenmikroskopie
quant.	quantitativ	STM	<i>scanning tunnel microscopy</i> , Rastertunnelmikroskopie
R	Rezeptor oder allgemeiner Rest	T	Thymin
r	„ratio“ – Verhältnis	Tab.	Tabelle
Rez	Rezeptor	TFA	Trifluoressigsäure
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
		Tween 20	Handelsname von Polysorbat 20
		x <sub>s</sub>	Molenbruch

### 8.3 ZUSÄTZLICHE EXPERIMENTELLE DATEN

#### HPLC-Daten

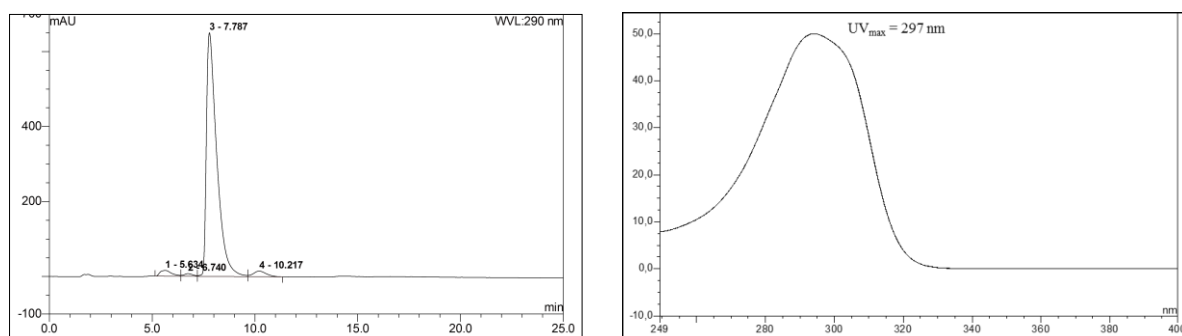


Abb. 8-1 HPLC-Lauf:  $r_t = 7.79$  min (Isokratisch: 66 % MeOH + 0.05 % TFA, , 94 % Reinheit bei 290 nm) mit UV-Spektrum des Produkts.

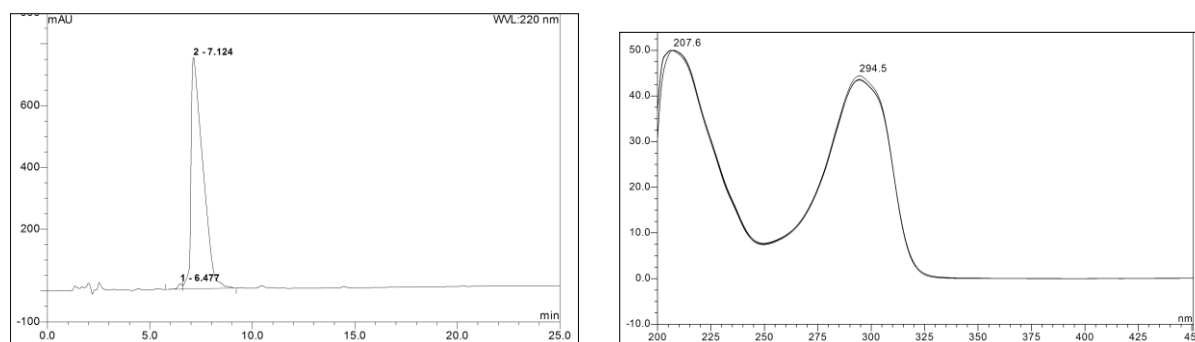


Abb. 8-2 HPLC-Lauf:  $r_t = 7.12$  min (Gradient: 10-100 % Methanol + 0.05 % TFA in 15 min, 96 % Reinheit bei 220 nm) mit UV-Spektrum des Produkts

#### UV/Vis-Titrationen

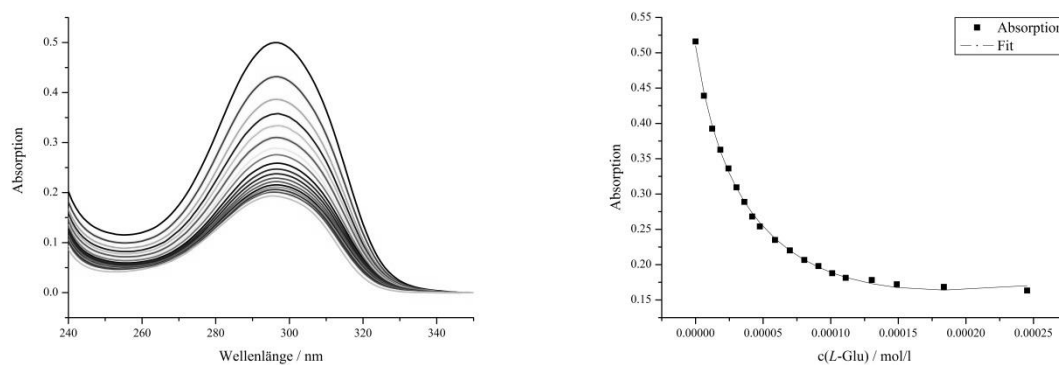


Abb. 8-3 UV-Titration von **65** mit L-Glu und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

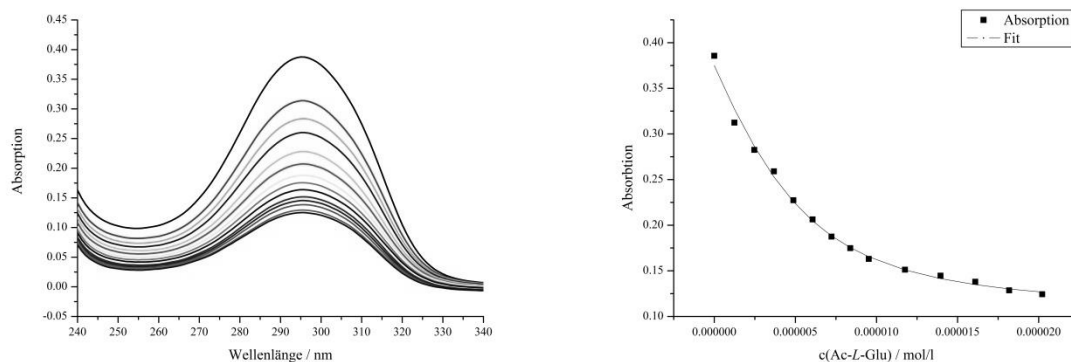


Abb. 8-4 UV-Titration von **65** mit Ac-L-Glu und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

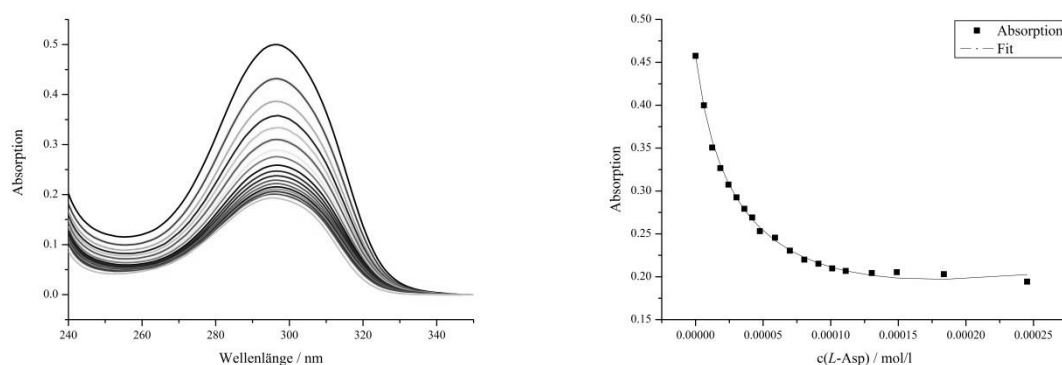


Abb. 8-5 UV-Titration von **65** mit L-Asp und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

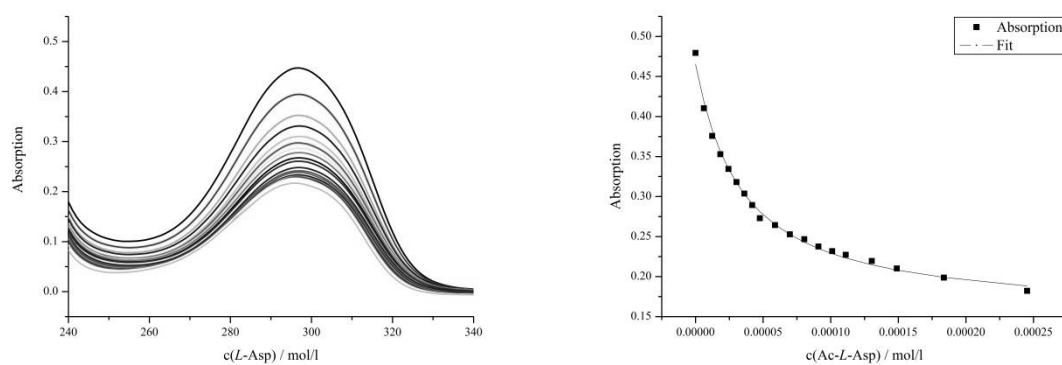


Abb. 8-6 UV-Titration von **65** mit Ac-L-Asp und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

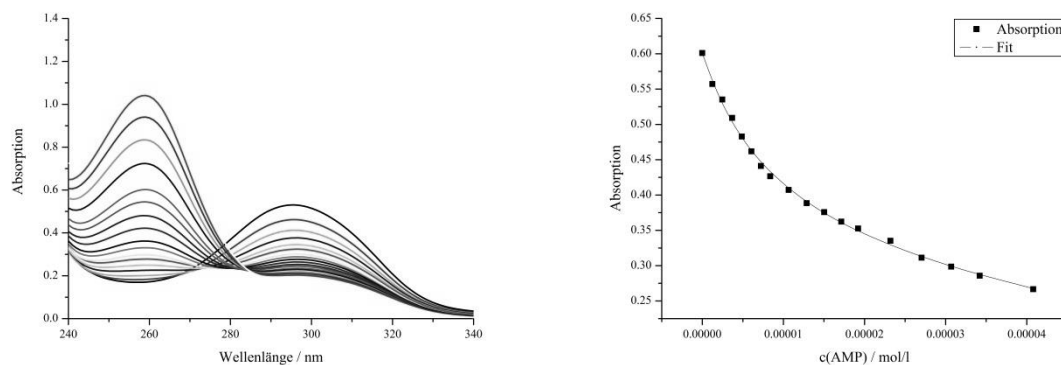


Abb. 8-7 UV-Titration von **65** mit AMP und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

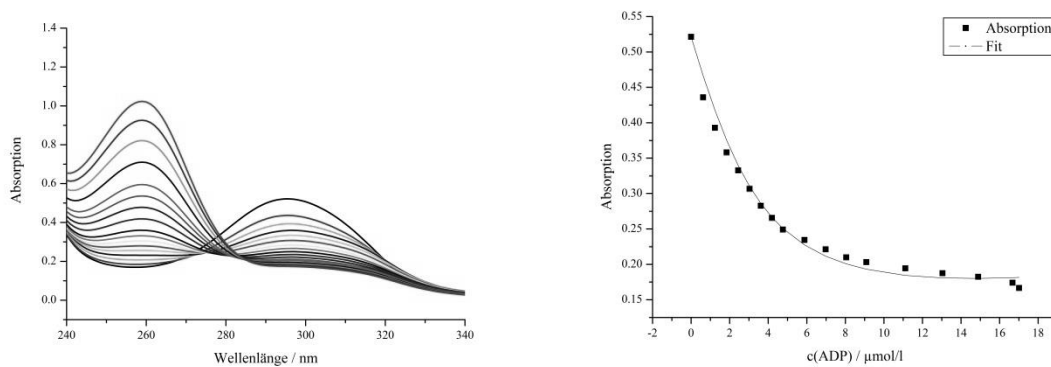


Abb. 8-8 UV-Titration von **65** mit ADP und. Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

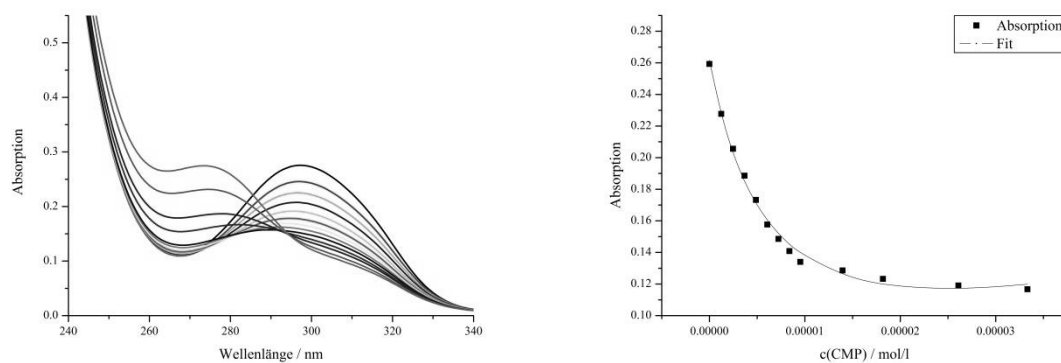


Abb. 8-9 UV-Titration von **65** mit CMP und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

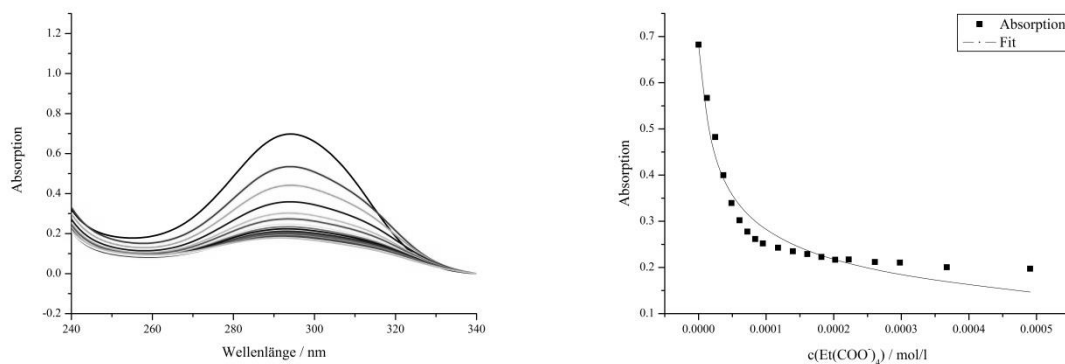


Abb. 8-10 UV-Titration von **65** mit  $\text{Et}(\text{COO}^-)_4$  und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit (hier: DMSO 0.5%).

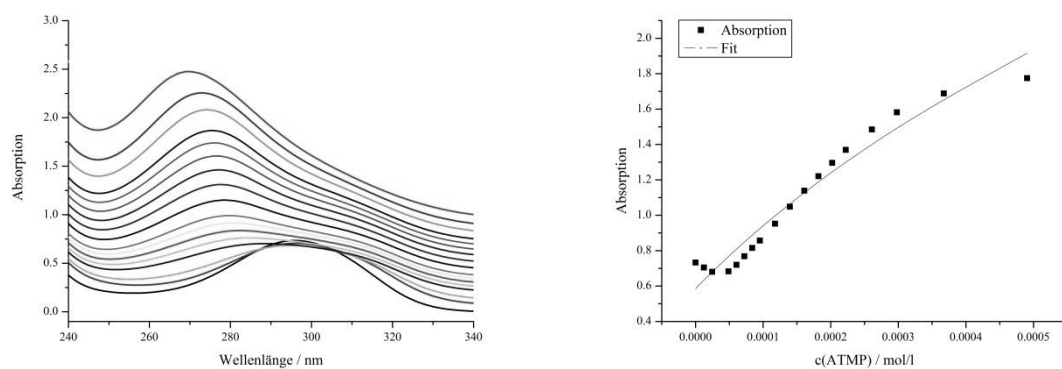


Abb. 8-11 UV-Titration von **65** mit ATMP und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.

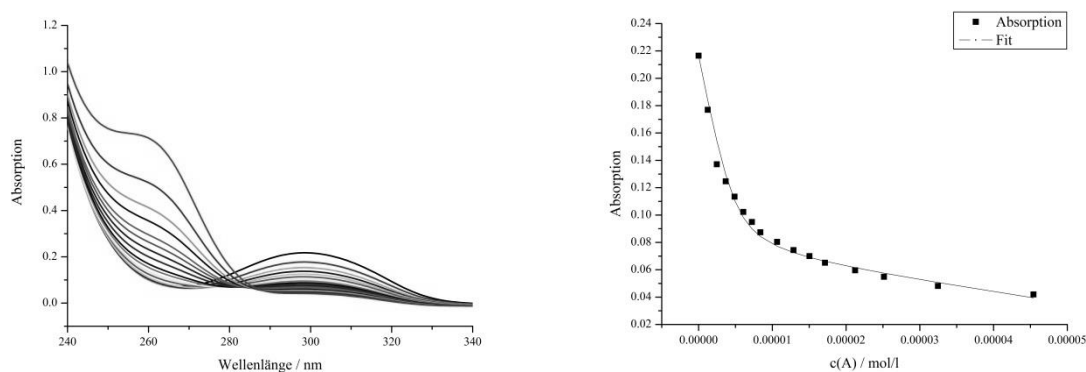


Abb. 8-12 UV-Titration von **65** mit Adenosin und Auftragung der Absorption bei 297 nm inklusive von SpecFit erzeugter Fit.



### ITC-Daten

Bedingungen: 1.5 mM Nucleotid in der Spritze, 0.1 mM **65** in der Zelle, TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6, 10 % DMSO). Die Sigmoid-Kurve wurde durch Integration der freiwerdenden Wärmemenge (links) erhalten, welche mit den Daten aus dem Verdünnungsexperiment (Mitte) korrigiert und gefittet wurde (rechts). Der Fit erfolgte über ein „one set of sites“-Bindungsmodell.

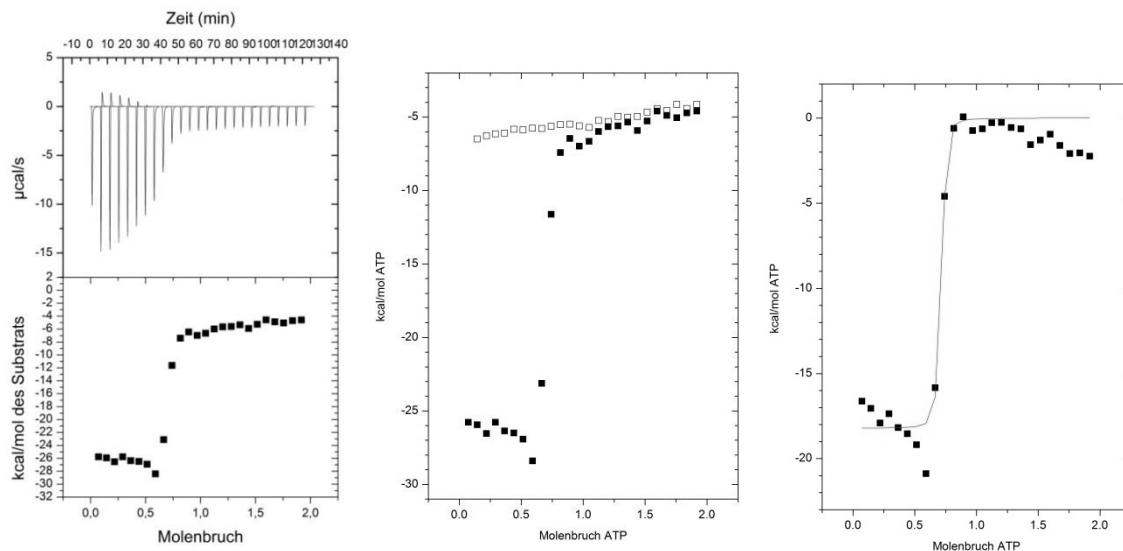


Abb. 8-13 ITC-Messung mit ATP.

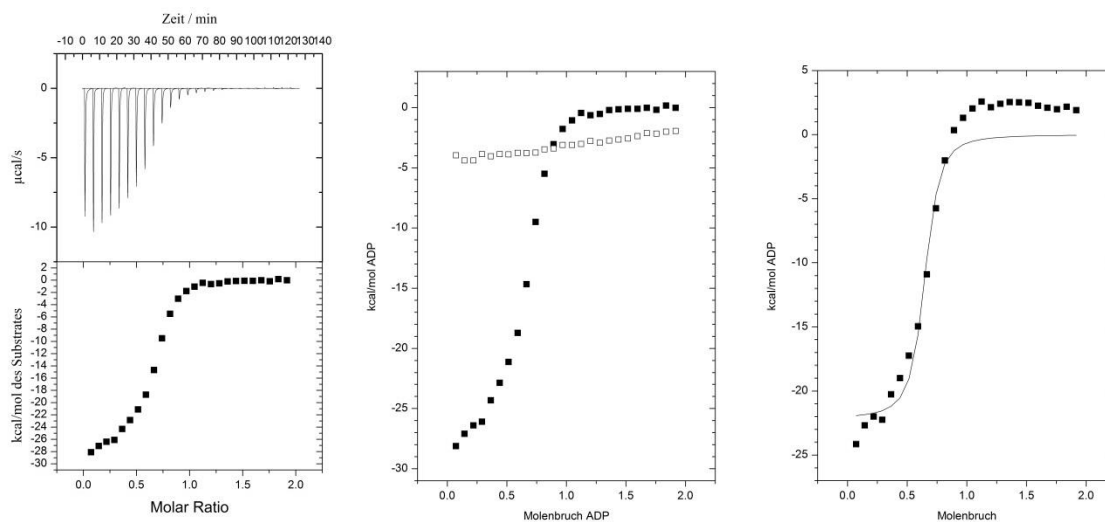


Abb. 8-14 ITC-Messung mit ADP.

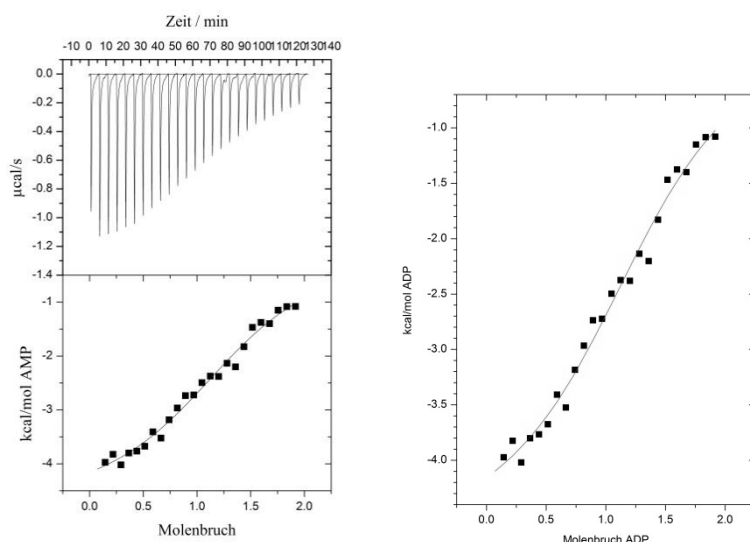


Abb. 8-15 ITC-Messung mit AMP.

Bedingungen: 0.1 mM **65** in der Spritze, 7  $\mu$ M ATP in der Zelle, TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6, 10 % DMSO). Die Sigmoid-Kurve wurde durch Integration der freiwerdenden Wärmemenge (links) erhalten, welche mit den Daten aus dem Verdünnungsexperiment (Mitte) korrigiert und gefittet wurde (rechts). Der Fit erfolgte über ein sequentielles Bindungsmodell.

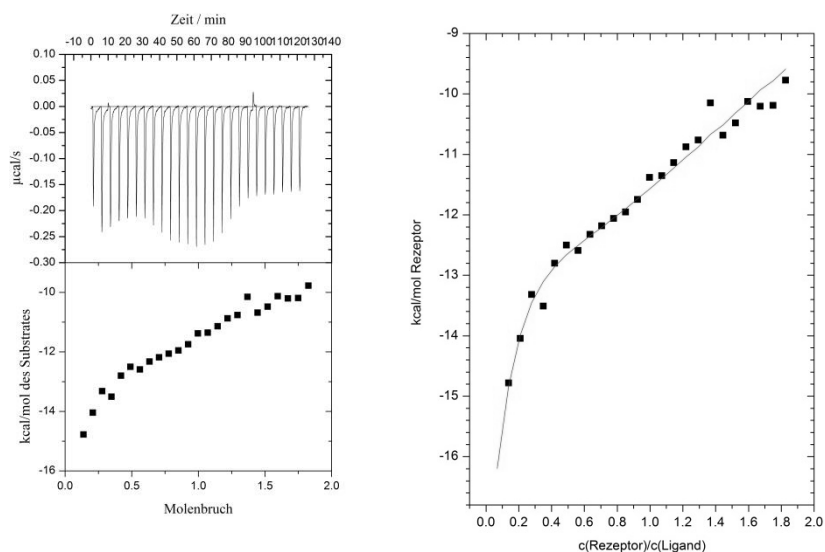
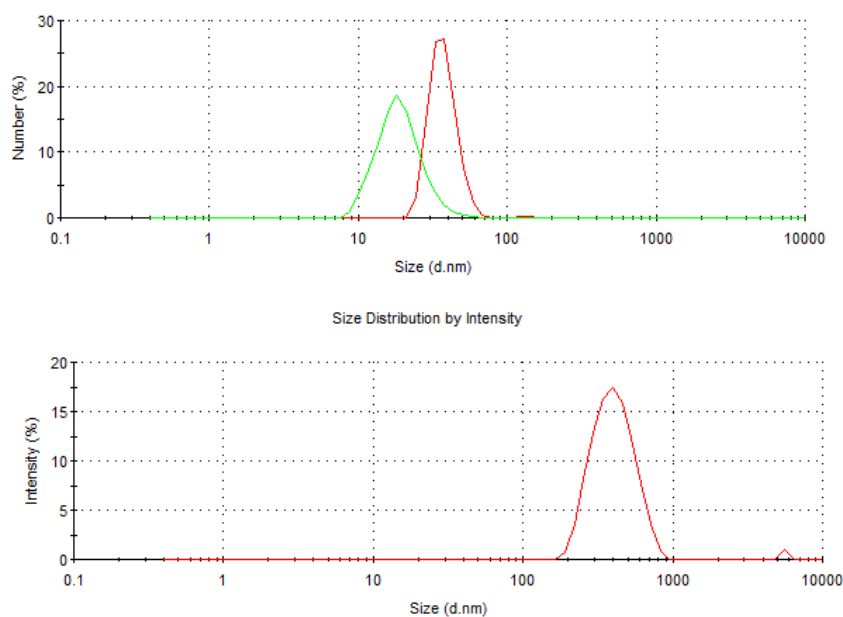


Abb. 8-16 Umgekehrte Titration von **65** zu ATP.

	ATP
$K / M^{-1}$	$8.67 \cdot 10^4 \pm 2.2 \cdot 10^4$
$\Delta H_1 / \text{kJ/mol}$	$-1.045 \cdot 10^5 \pm 2.06 \cdot 10^4$
$\Delta S_1 / \text{kJ/(mol} \cdot \text{K)}$	-328
$K_2 / M^{-1}$	$1.18 \cdot 10^5 \pm 6.0 \cdot 10^4$
$\Delta H_2 / \text{kJ/mol}$	$2.640 \cdot 10^5 \pm 4.22 \cdot 10^4$
$\Delta S_2 / \text{kJ/(mol} \cdot \text{K)}$	909
$K_3 / M^{-1}$	$8.22 \cdot 10^4 \pm 2.7 \cdot 10^4$
$\Delta H_3 / \text{kJ/mol}$	$-3.592 \pm 9.20 \cdot 10^4$
$\Delta S_3 / \text{kJ/(mol} \cdot \text{K)}$	$-1.18 \cdot 10^3$

Tab. 8-1 Auswertung des ITC-Experiments der Zugabe von **65** zu ATP unter Zuhilfenahme eines sequentiellen Bindungsmodus.

### DLS-Messung unter den Bedingungen der DPH-Messung



	c ( <b>65</b> ) / $\mu\text{M}$	Volumenstreuverh. / nm (%) , Peakbreite / nm	Anzahlstreuverh. / nm (%) , Peakbreite / nm	Durchschnitt / nm	PDI
Grün	5.0	34.95 (99.4), 22.5 4378 (0.6), 1273	23.2, (100), 7.45	58.2	0.368
Rot	10.0 <sup>a</sup>	240 (43.2), 105 39.1 (51.5), 9.34 5469 (5.7), 633	35.1, (99.2), 7.29 144.3, (0.8), 60.3	225.9	0.441
Lösemittel (unten)	0	456 (96.6), 154 5590 (3.4), 580	15.71, (100), 2.75	421.8	0.338

Abb. 8-17 DLS-Messungen mit **65** in TRIS-Puffer (0.01 M, pH 6, 1 % DMSO) mit einer Konzentration von 5- $\mu\text{M}$  (grün) und 10  $\mu\text{M}$  (rot). Dargestellt sind die Kurven des Anzahlstreuverhaltens. Die Größe der Strukturen ist über den Durchmesser in nm angegeben. <sup>a</sup> 10 min Ultraschall

Das Amphiphil **90** wurde mit variierender Konzentration (1-10  $\mu\text{Mol/l}$ ) zu einer 1  $\mu\text{M}$  Lösung des DPH **66** gegeben und diese Mischung mehrere Stunden mit Hilfe eines Peptidschüttlers geschwenkt. Diese Proben wurden mittels DLS nach 4 h, 17 h und 21 h untersucht.

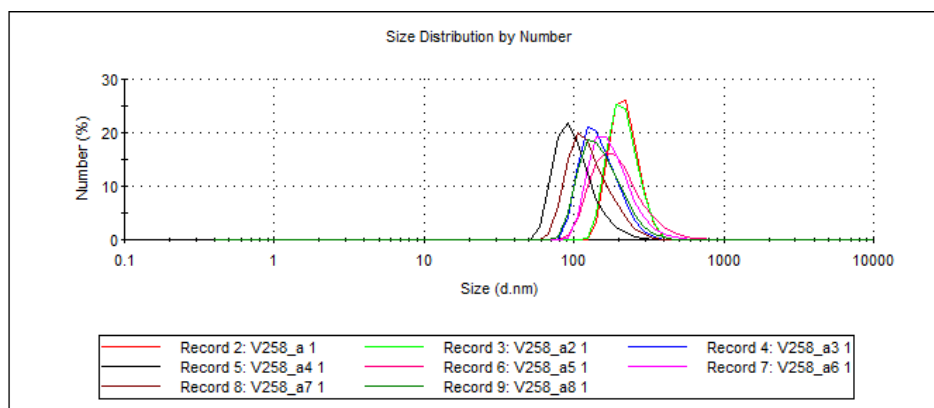


Abb. 8-18 Nur DPH **66** vor der Zugabe des Calixarens **90**.

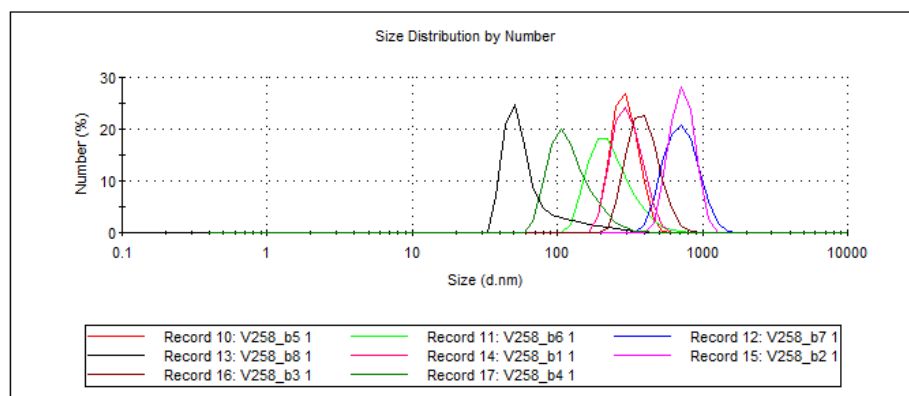


Abb. 8-19 DPH **66** unter Zugabe des Calixarens **90** und 4 h Mischen. Gute Messqualität nur für b8, schwarze Linie und damit einem 10fachen Überschuss an Calixaren.

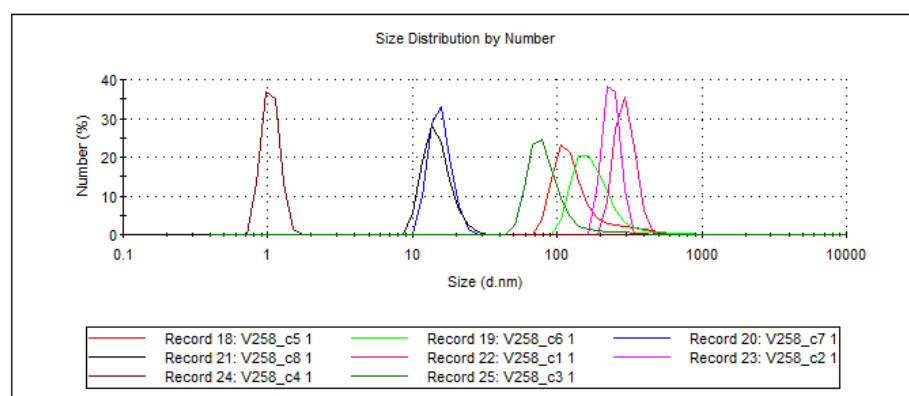
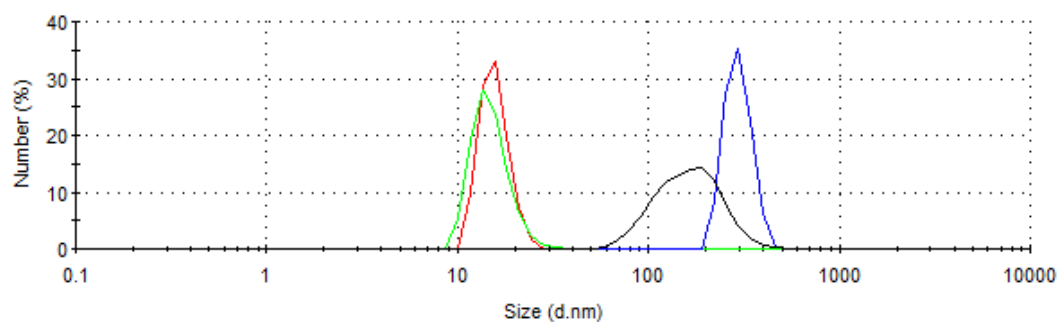


Abb. 8-20 DPH **66** unter Zugabe des Calixarens **90** und 17 h Mischen.

Auszug der Messungen nach 17 h:



Nr.	c ( <b>90</b> ) / $\mu\text{M}$	Volumenstreuverh./ d.nm (%), Peakbreite / d.nm	Anzahlstreuverh./ d.nm (%), Peakbreite / d.nm	Durchschnitt /d.nm	PDI
a	0.0	225.9 (82.3), 99.9 5072 (11.9), 943 1394 (5.7), 328	171.9, 68.2	299.5	0.413
b	2.00	356.8 (63.0), 123 100.6 (37.0), 29.9	90.07, 46.3	487.2	0.566
c	7.5	1093 (17.5), 215 16.74 (81.2), 3.15 68.02 (1.3), 12.2	15.71, 2.75	1112	0.995
d	10.0	199.2 (1.2), 70.3 17.27 (98.8), 4.62	15.3, 3.43	243.7	0.356

Abb. 8-21 DLS-Messung von DPH **66** ( $1 \mu\text{M}$ ) mit variierenden Anteilen Rezeptor **90** in Tris-Puffer (pH 6.0, 0.01 M, 1.1 % DMSO). schwarz: a, blau: b, rot: c, grün: d.

## Thermische Denaturierung

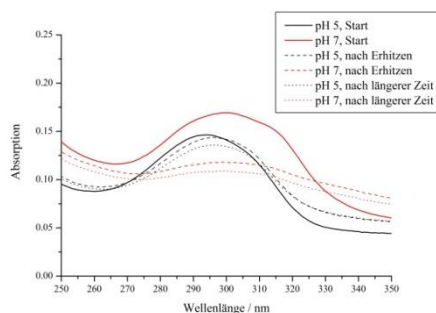


Abb. 8-22 Emissionsspektrum von **65** (52.6 µM) in Cacodylatpuffer (0.01 M, 5 % DMSO) bei pH 5 und 7. Die Probe wurde angesetzt und ein Emissionsspektrum aufgenommen (Start), im Anschluss wurde dieselbe Probe von 25 °C auf 99 °C erhitzt und nach Abkühlung auf 25 °C ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach Erhitzen). Diese Probe wurde über Nacht gelagert und ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach längerer Zeit).

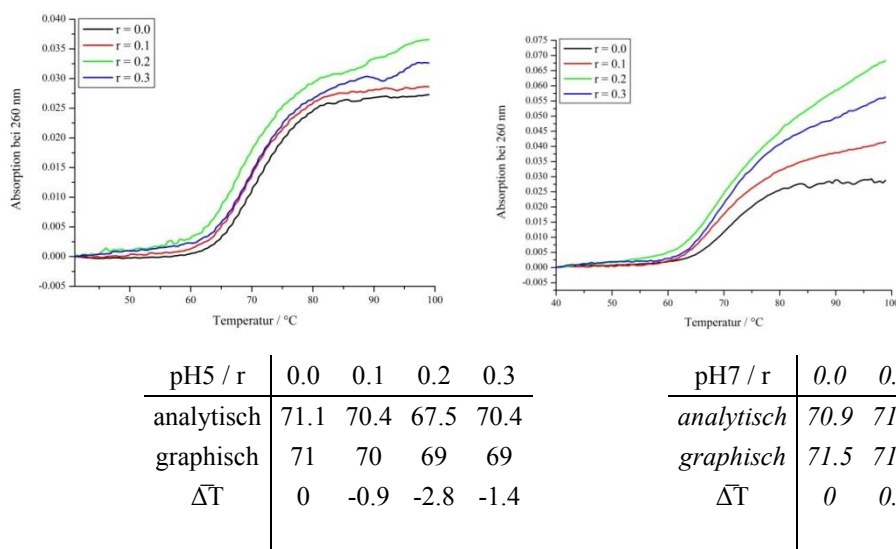


Abb. 8-23 Absorptionsspektrum von ctDNA (88 µM, Cacodylatpuffer (0.01 M, pH 5.00) bei 260 nm während einer Erwärmung von 25 °C auf 99 °C.  $r = \text{Verhältnis } n(\text{ctDNA})/n(\mathbf{65})$ ; links: pH = 5.0; rechts: pH = 6.0.

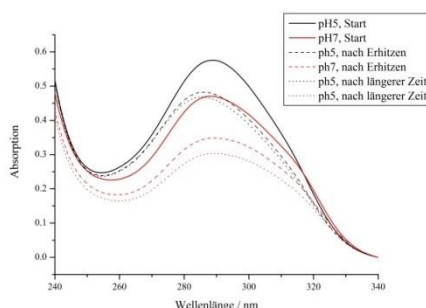
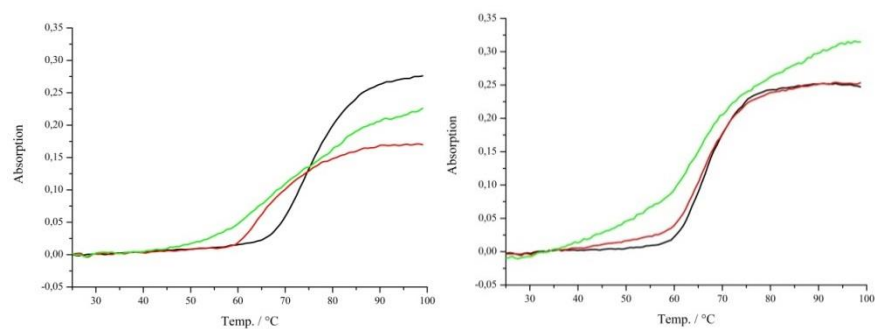


Abb. 8-24 Emissionsspektrum von **90** (10 µM) in Cacodylatpuffer (0.01 M, 1 % DMSO) bei pH 5 und 7. Die Probe wurde angesetzt und ein Emissionsspektrum aufgenommen (Start), im Anschluss wurde dieselbe Probe von 25 °C auf 99 °C erhitzt und nach Abkühlung auf 25 °C ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach Erhitzen). Diese Probe wurde über Nacht gelagert und ein weiteres Spektrum aufgenommen (nach längerer Zeit).



pH5 / r	0.0	0.1	0.3
analytisch	74.42	65	n.v.
graphisch	75.5	68	71.5
$\Delta T$	0	-8.46	-3.46

pH7 / r	0.0	0.1	0.3
analytisch	67.00	65.7	64.1
graphisch	66.97	66.50	65.5
$\Delta T$	0	-0.9	-2.2

Abb. 8-25 Absorptionsspektren, welche um die Absorption des Rezeptors **90** korrigiert wurden. Links: pH 5.0, rechts: pH 7.0. Kurven: 0.0 Å. (schwarz), 0.1 Å. (rot), 0.3 Å. (grün).

## AFM

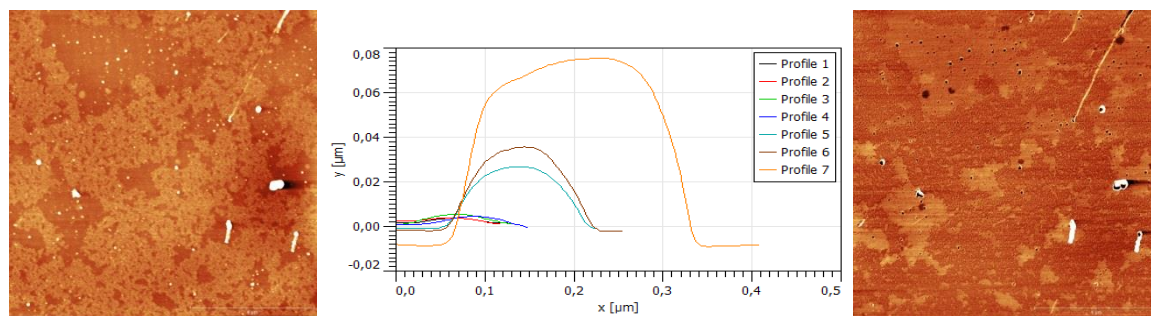


Abb. 8-26 Calixaren **65** in DMSO 0.01 mM. Links: Höhenprofil, mitte: Phasenbild

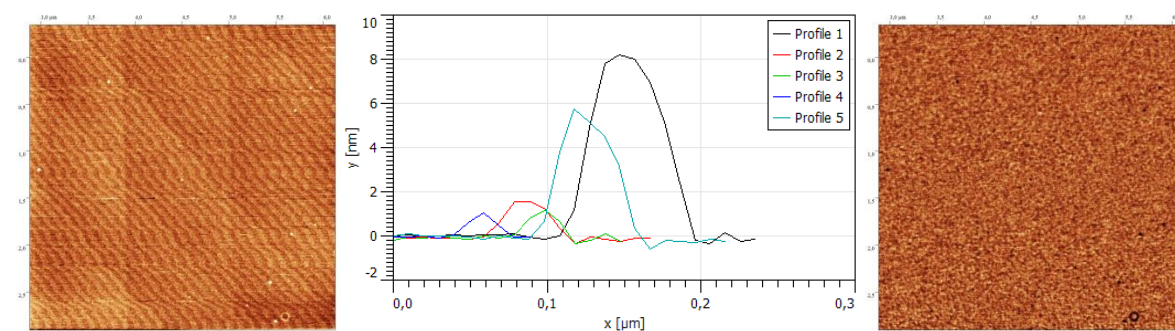


Abb. 8-27 Calixaren **65** in Wasser / 1 % DMSO 0.01 mM. Links: Höhenprofil, mitte: Phasenbild



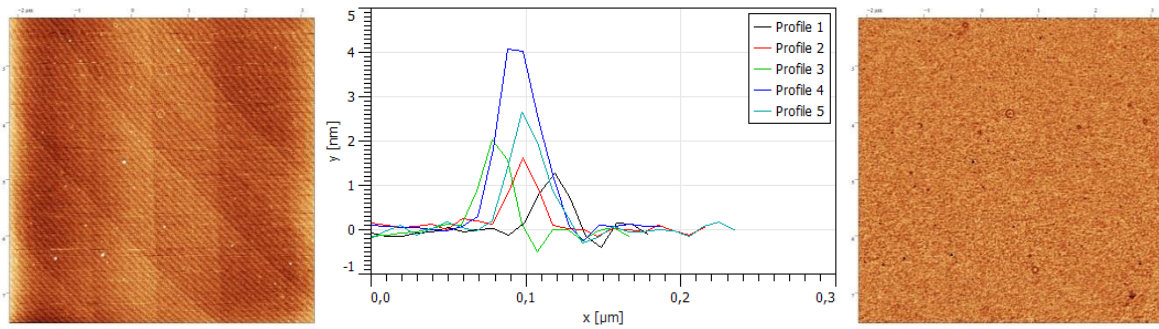


Abb. 8-28 Calixaren **65** in Wasser / 1 % DMSO 0.005 mM. Links: Höhenprofil, mitte: Phasenbild

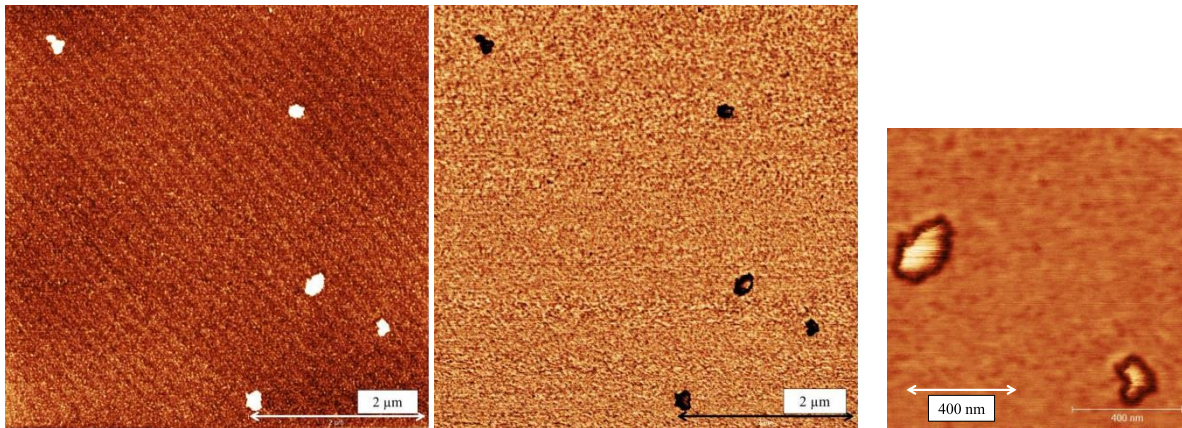


Abb. 8-29 Abb. 8-30 oben : AFM-Höhenprofil von **90** mit je zugehörigem Profil und weiterer Zoom des Profils.

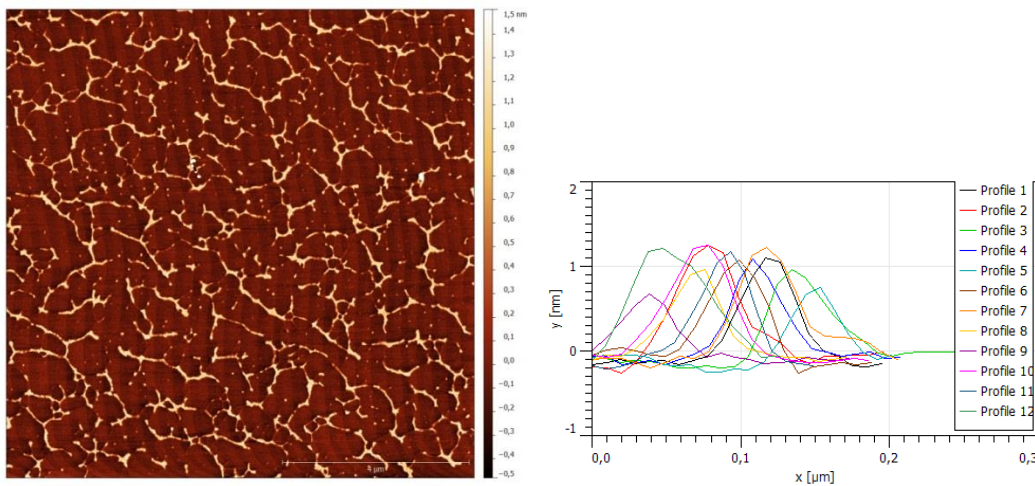


Abb. 8-31 AFM-Höhenprofil von ctDNA-Stammlösung (50  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (0.26 mM). : Höhen: 0.3 nm, 0.6 nm, 0.9 nm, 1.2 nm spricht für eine Überlagerung von einzelnen Strängen

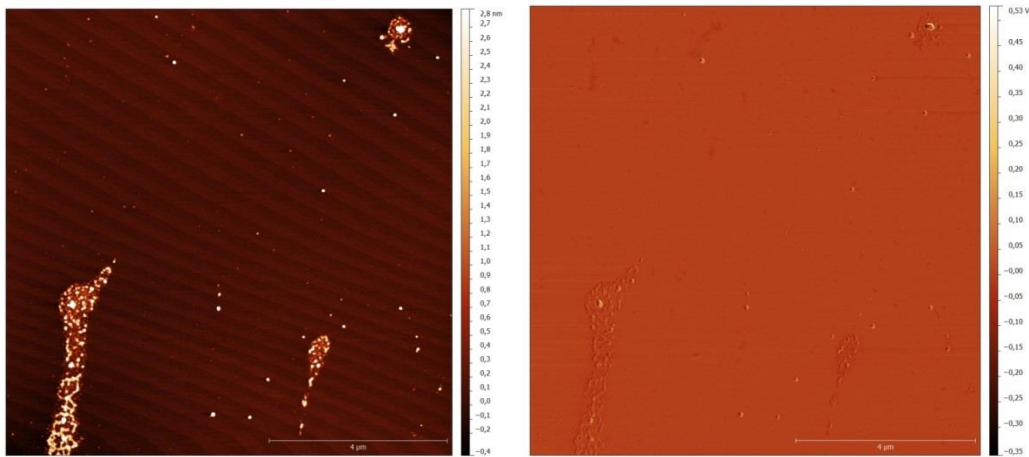


Abb. 8-32 Magnesiumchlorid-Lösung entsprechend den Messbedingungen.

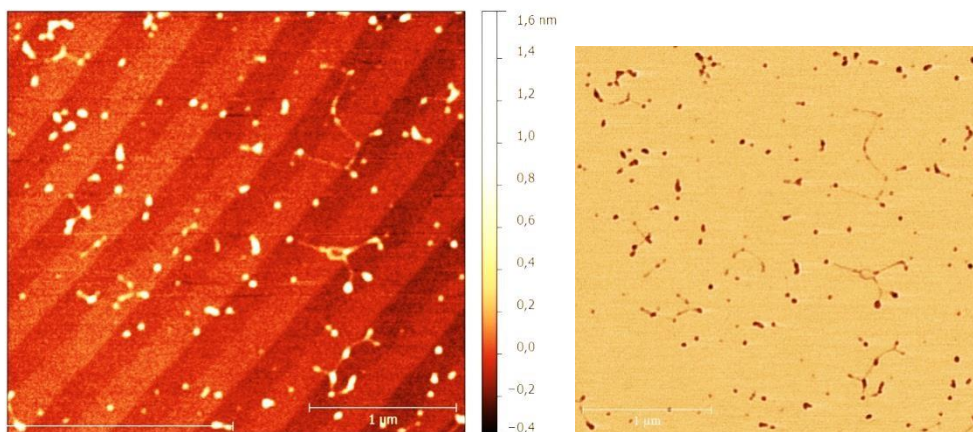


Abb. 8-33 AFM-Höhenprofil von ctDNA (5 µg/ml), MgCl<sub>2</sub> (0.26 mM); Höhenprofilbild 1 µm und zugehöriges Phasenbild. Man sieht sowohl strangartige verzweigte Strukturen als auch kompaktere kondensierte Aggregate. Die hochsymmetrischen Strukturen können MgCl<sub>2</sub> zugeordnet werden.

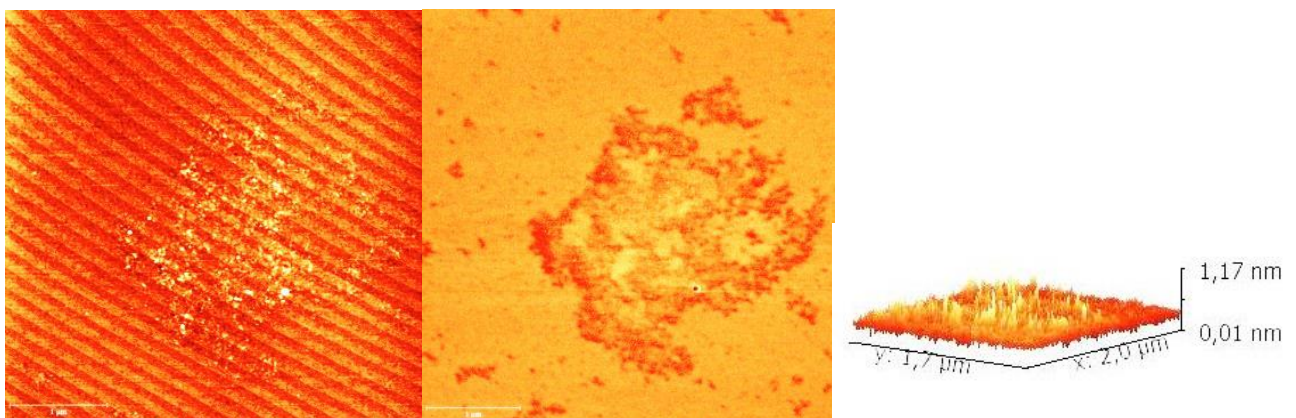


Abb. 8-34 AFM-Höhenprofil und -Phasen von ctDNA (5 µg/ml), MgCl<sub>2</sub> (0.26 mM) und 0.2 Äqu. 90; Es bildet sich eine großflächige sehr flache Strukturen mit einem Durchmesser von etwa  $2.60 \mu\text{M} \pm 0.246$  aus.



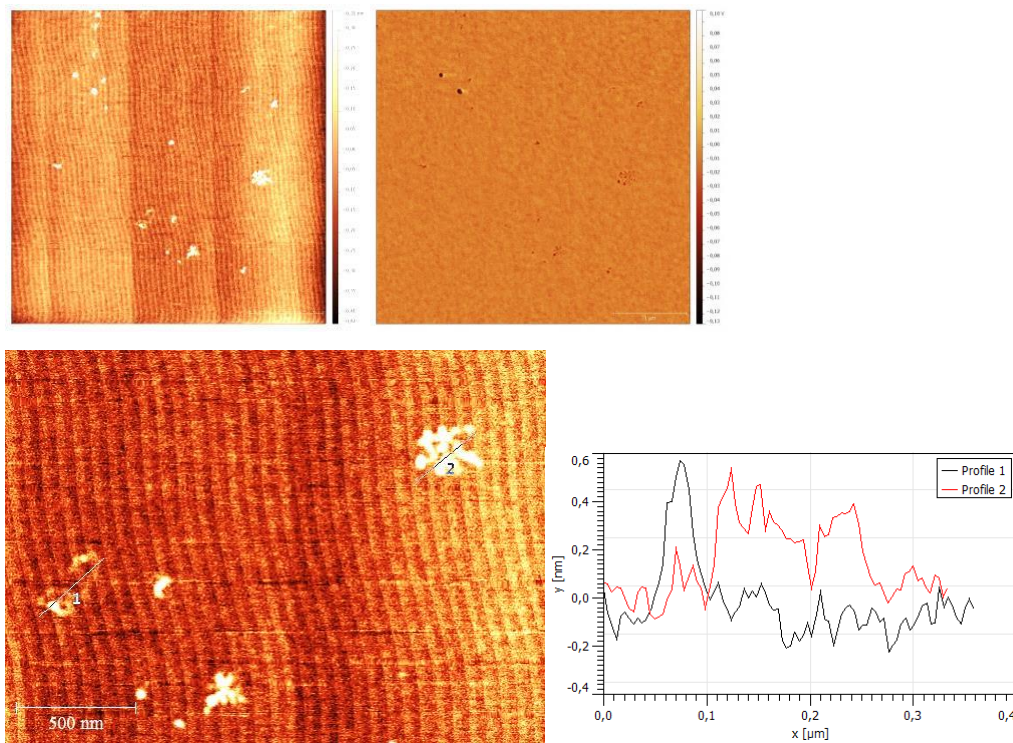


Abb. 8-35 AFM-Höhenprofil und -Phasen von ctDNA (5  $\mu\text{g/ml}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (0.26 mM) und 0.15 Äqu. 90.



## 8.4 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Kyba, E. P.; Helgeson, R. C.; Madan, K.; Gokel, G. W.; Tarnowski, T. L.; Moore, I. S. S.; Cram, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2564–2571.
- (2) Christianson, W.; Lipscomb, N. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 62–69.
- (3) Kim, D. H.; Park, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2967–2970.
- (4) Schmuck, C. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3053–3067.
- (5) Dixon, R. P.; Geib, S. J.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 365–366.
- (6) Schmuck, C.; Lex, J. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1779–1781.
- (7) Deutsche Forschungsgemeinde, Entwicklung der Gentherapie  
[http://www.dfg.de/service/presse/pressemitteilungen/2006/pressemitteilung\\_nr\\_71/index.html](http://www.dfg.de/service/presse/pressemitteilungen/2006/pressemitteilung_nr_71/index.html).
- (8) Nikol, S.; Berthold, H. *Dtsch. Arztebl.* **1996**, *41*, 2620–2628.
- (9) Brüning, H. Deutsche Gesellschaft für Gentherapie e.V. [www.dg-gt.de](http://www.dg-gt.de).
- (10) Winckler, T. *Pharm. Unserer Zeit* **2011**, *40*, 202–11.
- (11) Verma, I. M.; Weitzman, M. D. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 711–38.
- (12) Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985.
- (13) Koshland, D. E. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2468–2472.
- (14) Koshland, D. E., J. *PNAS* **1958**, *44*, 98–104.
- (15) Klemm, K. **2011**.
- (16) Lehn, J.-M. *Angew* **1988**, *100*, 91–116.
- (17) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry - Concepts und Perspectives*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, 1995.
- (18) Ma, J. C.; Dougherty, D. a. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303–1324.
- (19) Simmons, H. E.; Park, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2431–2432.
- (20) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2009.
- (21) Schmuck, C.; Heil, M. *Chemistry* **2006**, *12*, 1339–48.
- (22) Schmuck, C.; Hernandez-Folgado, L. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2390–4.
- (23) Schmuck, C.; Wich, P. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *277*, 3–30.
- (24) Schmuck, C.; Geiger, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8898–9.
- (25) Schmuck, C. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 709–18.
- (26) Schmuck, C. *European J. Org. Chem.* **1999**, 2397–2403.
- (27) Schmuck, C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3063–3067.

- (28) Schlund, S.; Schmuck, C.; Engels, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11115–24.
- (29) Gutsche, C. D. *Calixarenes*; Stoddart, J. F., Ed.; Royal Society of Chemistry: London, 1989; p. 222.
- (30) Böhmer, V. *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 785–818.
- (31) Diamond, D.; McKervey, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *25*, 15.
- (32) Grootenhuys, P. D. J.; Kollman, P. A.; Groenen, L. C.; Reinhoudt, D. N.; Hummel, G. J. Van; Ugozzoli, S. F.; Andreettil, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4165–4176.
- (33) Kellermann, M.; Bauer, W.; Hirsch, A.; Schade, B.; Ludwig, K.; Böttcher, C. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3019–3022.
- (34) Gruen, D. W. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *84*, 281–283.
- (35) Helttunen, K.; Shahgaldian, P. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2704–2714.
- (36) Strobel, M.; Kita-Tokarczyk, K.; Taubert, a.; Vebert, C.; Heiney, P. a.; Chami, M.; Meier, W. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 252–259.
- (37) Stoikov, I. I.; Yushkova, E. a.; Bukharaev, A. a.; Biziaev, D. a.; Selivanovskaya, S. Y.; Chursina, M. a.; Antipin, I. S.; Konovalov, A. I.; Zharov, I. *J. Phys. Org. Chem.* **2012**, *25*, 1177–1185.
- (38) Mchedlov-Petrosyan, N. O.; Vodolazkaya, N. a.; Rodik, R. V.; Bogdanova, L. N.; Cheipesh, T. a.; Soboleva, O. Y.; Kryshtal, a. P.; Kutuzova, L. V.; Kalchenko, V. I. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 120426111930003.
- (39) Michels, J. J.; Huskens, J.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *Langmuir* **2000**, *16*, 4864–4870.
- (40) Atwood, J. L.; Hamada, F.; Robinson, K. D.; Orr, W. G.; Vincent, R. L. *Nature* **1991**, *349*, 683–4.
- (41) Atwood, J. L.; Dalgarno, S. J.; Hardie, M. J.; Raston, C. L. *Chem. Commun.* **2005**, 337–9.
- (42) Coleman, A. W.; Bott, S. G.; Morley, S. D.; Means, C. M.; Robinson, K. D.; Zhang, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *1*, 1361–1362.
- (43) Zadnád, R.; Schrader, T. In *Calixarenes in the Nanoworld*; Vincens, J.; Harrowfield, J., Eds.; Springer: Dordrecht, 2007; pp. 287–309.
- (44) Hwang, K. M.; Qi, Y. M.; S.-Y., L.; Choy, W.; Chen, J. Treatment of inflection by enveloped virus with calix[n]arene compound **1995**, *14*.
- (45) Atwood, J. L.; Bridges, R. J.; Juneja, R. K.; Singh, A. K. Calixarene chloride-channel blockers **1996**.

- (46) Coleman, A. W.; Aly, P.; Française, A.; Sanitaire, D. S.; Lyon, S. *De Top. Curr. Chem.* **2007**, 31–88.
- (47) Zielenkiewicz, W.; Marcinowicz, A.; Poznański, J.; Cherenok, S.; Kalchenko, V. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, 55, 11–19.
- (48) Da Silva, E.; Coleman, A. W. *Tetrahedron* **2003**, 59, 7357–7364.
- (49) Danylyuk, O.; Suwinska, K. *Chem. Commun. (Camb)*. **2009**, 5799–813.
- (50) Sansone, F.; Chierici, E.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1802–9.
- (51) Hamuro, Y.; Calama, M. C.; Park, H. S.; Hamilton, A. D. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, 36, 2680–2683.
- (52) Sansone, F.; Baldini, L.; Casnati, A.; Ungaro, R. *New J. Chem.* **2010**, 34, 2715.
- (53) Baldini, L.; Casnati, A.; Sansone, F.; Ungaro, R. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 254–66.
- (54) Yin, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 4130–63.
- (55) Wei, Y.; McLendon, G. L.; Case, M. a.; Purring, C. B.; Yu, T.; Hamilton, A. D.; Lin, Q.; Park, H. S.; Lee, C.-S. *Chem. Commun.* **2001**, 1580–1581.
- (56) Mecca, T.; Consoli, G. M. L.; Geraci, C.; Cunsolo, F. Designed calix[8]arene-based ligands for selective tryptase surface recognition **2004**, 5057–5062.
- (57) Francese, S.; Cozzolino, A.; Caputo, I.; Esposito, C.; Martino, M.; Gaeta, C.; Troisi, F.; Neri, P. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 1611–1615.
- (58) Schmuck, C.; Engels, B.; Schirmeister, T.; Fink, R. *Chemie für Mediziner*; Pearson St.; 2008.
- (59) Claude, S.; Lehn, J.; Schmidt, F.; Vigneron, J.-P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1182–1185.
- (60) Shi, Y.; Schneider, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 1797–1803.
- (61) Schneider, H.-J.; Blatter, T. *Angew. Chemie* **1992**, 104, 1244–1246.
- (62) Büning, H. *Pharm. Unserer Zeit* **2011**, 40, 194–201.
- (63) Villemejeane, J.; Mir, L. M. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 157, 207–19.
- (64) Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84, 7413–7.
- (65) Aissaoui, A.; Oudrhiri, N.; Petit, L.; Hauchecorne, M.; Kan, E.; Sainlos, M.; Julia, S.; Navarro, J.; Vigneron, J.-P.; Lehn, J.-M.; Lehn, P. *Curr. Drug Targets* **2002**, 3, 1–16.
- (66) Bagnacani, V.; Sansone, F.; Donofrio, G.; Baldini, L.; Casnati, A.; Ungaro, R. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3953–6.
- (67) Abel, T.; Kreppel, F.; Ogris, M.; Büning, H. *Pharm. Unserer Zeit* **2011**, 40, 225–38.
- (68) Sonawane, N. D.; Szoka, F. C.; Verkman, a S. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 44826–31.

- (69) Wattiaux, R.; Laurent, N.; Wattiaux-De Coninck, S.; Jadot, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 201–8.
- (70) Kuchelmeister, H. Y.; Gutschmidt, A.; Tillmann, S.; Knauer, S.; Schmuck, C. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 996.
- (71) Kuchelmeister, H. Y. *Diss.* **2011**.
- (72) Patel, M.; Vivien, E.; Hauchecorne, M.; Oudrhiri, N.; Ramasawmy, R.; Vigneron, J. P.; Lehn, P.; Lehn, J. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 536–43.
- (73) Sansone, F.; Dudic, M.; Donofrio, G.; Rivetti, C.; Baldini, L.; Casnati, A.; Cellai, S.; Ungaro, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14528–36.
- (74) Ogura, T.; Wilkinson, J. *Genes to cells* **2001**, *6*, 575–97.
- (75) DeLaBarre, B.; Christianson, J. C.; Kopito, R. R.; Brunger, A. T. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 451–62.
- (76) Meyer, H. H.; Kondo, H.; Warren, G. *FEBS Lett.* **1998**, *437*, 255–7.
- (77) Dreveny, I.; Kondo, H.; Uchiyama, K.; Shaw, A.; Zhang, X.; Freemont, P. S. *EMBO J.* **2004**, *23*, 1030–9.
- (78) Hirose, K. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193–209.
- (79) Connors, K. *Binding Constants - The Measurement of Molecular Complex Stability*; John Wiley & Sons, 1987.
- (80) Roselin, L. S.; Lin, M.-S.; Lin, P.-H.; Chang, Y.; Chen, W.-Y. *Biotechnol. J.* **2010**, *5*, 85–98.
- (81) Holdgate, G. A. *Biotechniques* **2001**, *31*, 164–184.
- (82) Ladbury, J. E.; Doyle, M. L. *Biocalorimetry*; Wiley-VCH Verlag GmbH: London, 2004.
- (83) Ladbury, J. E. *Biotechniques* **2004**, *37*, 885–7.
- (84) Cooper, A. **2002**.
- (85) Alessandrini, A.; Facci, P. *Meas. Sci. Technol.* **2005**, *16*, R65–R92.
- (86) Palm, B. S.; Piantanida, I.; Mladen, Z.; Schneider, H.-J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, *2000*, 385–392.
- (87) Brabec, V.; Reedijk, J.; Leng, M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12397–12402.
- (88) Zimmer, C.; Wähnert, U. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1986**, *47*, 31–112.
- (89) Waring, M. J. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 269–282.
- (90) Alonso, A.; Almendral, M. J.; Curto, Y.; Criado, J. J.; Rodríguez, E.; Manzano, J. L. *Anal. Biochem.* **2006**, *355*, 157–64.
- (91) Cain, B. F.; Baguley, B. C.; Denny, W. a. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 658–668.

- (92) Ungaro, R.; Pochini, A. In *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry*; Schneider, H.-J.; Dürr, H., Eds.; VCH, 1991.
- (93) Ramadan, K.; Bruderer, R.; Spiga, F. M.; Popp, O.; Baur, T.; Gotta, M.; Meyer, H. H. *Nature* **2007**, *450*, 1258–62.
- (94) Kuchelmeister, H. Y. *Diss.* **2011**.
- (95) Hernandez-Folgado, L.; Schmuck, C.; Tomić, S.; Piantanida, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2977–81.
- (96) Klemm, K. *Diss.* **2011**.
- (97) Schmuck, C.; Bickert, V.; Merschky, M.; Geiger, L.; Rupprecht, D.; Dudaczek, J.; Wich, P.; Rehm, T.; Machon, U. *European J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 324–329.
- (98) Zapf, C. W.; Creighton, C. J.; Tomioka, M.; Goodman, M. **2001**, 2–5.
- (99) No, K.; Noh, Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1986**, *7*, 314.
- (100) Kämmerer, H.; Happel, G.; Böhmer, V.; Rathay, D. *Monatsh. für Chemie* **1978**, *109*, 767–773.
- (101) Gutsche, C. D.; M., I. *Org. Synth.* **1993**, *Coll. Vol.*, 75.
- (102) Wang, P.-S.; Lin, R.-S.; Zong, H.-X. *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 2225–2227.
- (103) Van Wageningen, A. M. A.; Snip, E.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; Boerrigter, H. *Liebigs Ann.* **1997**, 2235–2245.
- (104) Gutsche, C. D.; Nam, K. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6153–6162.
- (105) Tashiro, M.; Fukata, G.; Mataka, S.; Oe, K. *Org. Prep. Proced. Int.* **1975**, *7*, 231–236.
- (106) Rehm, M. *Diss.* **2006**.
- (107) Hermann, K.; Günter, H.; Friedrich, C.; Phenollaldehyd-kondensate, C. *Makromol. Chem.* **1972**, *162*, 179–197.
- (108) Jaime, C.; De Mendoza, J.; Prados, P.; Nieto, P. M.; Sanchez, C. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3372–3376.
- (109) Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbühler, A. D. *Talanta* **1986**, *33*, 943–951.
- (110) Shinkai, S.; Araki, K.; Grootenhuis, P. D. J.; Reinhoudt, D. N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1991**, 1883–1886.
- (111) Kellermann, M.; Bauer, W.; Hirsch, A.; Schade, B.; Ludwig, K.; Böttcher, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 2959–62.
- (112) Chattopadhyay, a; London, E. *Anal. Biochem.* **1984**, *139*, 408–12.
- (113) Schmuck, C.; Schwegmann, M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3517–20.
- (114) Schmuck, C.; Rupprecht, D.; Wienand, W. *Chemistry* **2006**, *12*, 9186–95.
- (115) Schmuck, C.; Bickert, V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6832–9.

- 
- (116) Wich, P. R.; Schmuck, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 4113–6.
- (117) Kuchelmeister, H. Y.; Schmuck, C. In *Designing Receptors for the Next Generation of Biosensors*; 2012.
- (118) Geibel, B. *Diss.* **2013**.
- (119) Lanzetta, P. a; Alvarez, L. J.; Reinach, P. S.; Candia, O. a *Anal. Biochem.* **1979**, *100*, 95–7.
- (120) Itsuno, S.; Uchikoshi, K.; Ito, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8187–8188.
- (121) Nomura, E.; Hosoda, A.; Takagaki, M.; Mori, H.; Miyake, Y.; Shibakami, M.; Taniguchi, H. *Langmuir* **2010**, *26*, 10266–70.
- (122) Saddeler, S. *Bachelor Arbeit* **2012**.
- (123) Strobel, M. *Diss.* **2004**.
- (124) Rivetti, C.; Guthold, M.; Bustamante, C. *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 919–32.
- (125) Morgan, A. R.; Lee, J. S.; Pulleyblank, D. E.; Murray, N. L.; Evans, D. H. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 547–565.
- (126) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 6th ed.; 2002.
- (127) Tashiro, M. *Synthesis (Stuttg.)*. **1979**, *12*, 921.
- (128) Arduini, A.; Casnati, A.; Fabbi, M.; Minari, P.; Pochini, A.; Sicuri, A. R.; Ungaro, R. *Supramol. Chem.* **1993**, *1*, 235–246.
- (129) Dietrich, F. V.; Knauer, P. S.; Karczewski, S. **2012**.
- (130) Moss, G. P.; Smith, P. A. S.; Tavernier, D. *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1307–1375.



## 8.5 PUBLIKATIONSLISTE

Schmuck, C., Michels, U., Dudaczek, J. Hydrolytic activity of histidine-containing octapeptides in water identified by quantitative screening of a combinatorial library. *Organic & biomolecular chemistry*, **2009**, 7(21), 4362–8.

Öffentliche Konferenzbeiträge:

U. Michels, C. Schmuck; Screening of a combinatorial library for catalytic efficiency for C-C-bond forming reactions in water, 2<sup>nd</sup> EuChemMS Chemistry Congress, Turin, 16. – 20. September **2008**.

U. Michels, C. Schmuck; Screening of a combinatorial library for catalytic efficiency for C-C-bond forming reactions in water, 1<sup>st</sup> jCS Ruhr, Bochum, **2010**.

Posterpräsentation: U. Michels, C. Schmuck; Protein Surface Recognition by Synthetic Receptors, 2<sup>nd</sup> jCS Ruhr, Essen, 22. September **2011**.

## 8.6 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**Entwicklung neuer polykationischer Rezeptoren zur molekularen Erkennung und als  
Vektoren in der Gentransfektion**

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Essen, den

Ute Schlund